

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie

Abteilung für Nuklearmedizin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Thomas M. Behr

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit
dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

„Entwicklung neuer radioaktiv markierbarer pan-Somatostatin-Analoga zur
nuklearmedizinischen Diagnostik und Therapie“

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich der Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ulrike Drückler

aus

Erfurt

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 26.04.2007

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. T. M. Behr (gutachterliche Betreuung Prof. Dr. F. Czubyko)

Korreferent: Prof. Dr. U. Sure

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
	1.1 Peptide	1
	1.2 Gastrointestinale Peptidhormone und Neurotransmitter	1
	1.3 Radioaktiv markierte Peptide als Radiopharmazeutika	3
	1.3.1 Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)	5
	1.3.2 Cholezystokinin und Gastrin	6
	1.3.3 Bombesin / Gastrin-releasing-Peptide (GRP)	7
	1.3.4 Substanz P	7
	1.4 Somatostatin	8
	1.5 Somatostatin-Rezeptor	9
	1.6 Funktionsweise G-Protein gekoppelter Rezeptoren	13
	1.7 Internalisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	14
	1.8 Entwicklung und klinische Anwendung von Somatostatin-Analoga	15
	1.9 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	19
2.	Material und Methoden	20
	2.1 Kopplung und Markierung	20
	2.1.1 Kopplung von DTPA an Somatostatin-Derivate	21
	2.1.2 Peptidmarkierung mit dem Radionuklid Indium-111	22
	2.1.3 Qualitätskontrolle der Markierung	22
	2.2 Überprüfung der Serumstabilität	23
	2.3 Zellkultur	23
	2.3.1 Zelllinie und Kultur	23
	2.3.2 Internalisierung der Peptide in AR42J-Zellen	24
	2.4 Tierversuche	25

3.	Resultate	27
	3.1 Qualitätskontrollen der Indium-111 markierten Octreotid-Analoga	27
	3.2 Serumstabilitätsprofile	28
	3.3 Zellversuche	31
	3.4 Biodistribution	33
	3.4.1 Biodistribution von U1, U2 und U3 nach 4 Stunden	33
	3.4.2 Biodistribution von U1 nach 1, 4 und 24 Stunden	36
	3.4.3 Biodistribution der verschiedenen Octreotid-Analoga	38
4.	Diskussion	39
	4.1 Diagnostische und therapeutische Anwendungsbereiche von Somatostatin-Analoga	39
	4.2 Neuroendokrine Tumoren des Verdauungstraktes	43
	4.2.1 Karzinoide	43
	4.2.2 Diagnostik von Karzinoiden	45
	4.2.3 Therapie von Karzinoiden	46
	4.2.4 Nebenwirkungen der Therapie mit Somatostatin-Analoga	48
	4.3 Radiopharmakologische Therapie neuroendokriner Tumoren	48
	4.4 Kopplung von Indium-111 an das DTPA-Peptid	49
	4.5 Komplexstabilität in humanem Serum	50
	4.6 In vitro Bindungs- und Internalisierungsstudien	52
	4.7 Biodistribution im Mausmodell	53
	4.8 Zukunftsperspektiven	55
5.	Zusammenfassung	57
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Anhang	71

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb.1.1	18
Abb.2.1	25
Abb.3.1	29
Abb.3.2	29
Abb.3.3	29
Abb.3.4	30
Abb.3.5	32
Abb.3.6	35
Abb.3.7	37
Abb.4.1	47

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab.1.1	2
Tab.1.2	5
Tab.1.3	9
Tab.1.4	12
Tab.1.5	13
Tab.1.6	15
Tab.1.7	16
Tab.2.1	20
Tab.3.1	27
Tab.3.2	28
Tab.3.3	31
Tab.3.4	35
Tab.3.5	37
Tab.4.1	46

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
Ala	Alanin
APUD	amine precursor uptake and decarboxylation
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
β 2Ars	β 2-adrenerge Rezeptoren
Bq	Bequerel
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CCK	Cholezystokinin
cpm	Counts pro Minute
Cu	Kupfer
DIPEA	Ethylendiisopropylamin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	tetraazazyklododecane-tetraacetic acid
DTPA	Diethylen-Triamin-Pentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	endothelial growth factor
et al.	und andere
etc.	et cetera
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
Ga	Gallium
GDP	Guanosin-diphosphat
GH	Growth hormon
GHRF	Growth hormon releasing factor
Glu	Glutaminsäure

Gly	Glycin
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRP	Gastrin releasing peptide
GTP	Guanosin-triphosphat
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
5-HIAA	5-Hydroxiindolessigsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HVL	Hypophysenvorderlappen
¹¹¹ In	Indium-111
IGF	insulin-like growth factor
injiz. Dosis/g	injizierte Dosis pro Gramm
i.v.	intravenös
Lu	Lutetium
Lys	Lysin
M	Molar
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MTC	medulläres Schilddrüsenkarzinom
MW	Mittelwert
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
PET	Positronen-Emissionstomographie
PBS	phosphate-buffered saline
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
SMS	Somatostatin
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
STH	somatotropes Hormon
t	Zeit

Tab.	Tabelle
Tc	Technetium
TFA	Trifluoressigsäure
Trp	Tryptophan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
Y	Yttrium
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Kapitel 1

EINLEITUNG

1.1 Peptide

Peptide haben im Organismus die vielfältigsten Funktionen. Sie dienen unter anderem als Hormone, Neurotransmitter und Redoxsysteme. Sie entstehen meist durch Proteolyse aus Proteinvorstufen und vermitteln durch die Bindung an peptidspezifische Zellmembranrezeptoren eine große Zahl an Wechselwirkungen, wie zum Beispiel Zell-Zell-Wechselwirkungen, Erkennung fremder Moleküle oder die Vermittlung von spezifischen Hormonsignalen in die Zielzelle.

1.2 Gastrointestinale Peptidhormone und Neurotransmitter

Die funktionellen Zustände einzelner Darmabschnitte sowie aller an der Verdauung beteiligten Organe müssen sehr genau aufeinander abgestimmt werden, um eine optimale Resorption und Digestion der aufgenommenen Nahrung zu gewährleisten. Darüber hinaus besitzt der Intestinaltrakt eine große Bedeutung für die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes des Organismus. Eine Vielzahl gastrointestinaler Hormone ist an der koordinierten Regulation dieser komplexen Prozesse beteiligt. Diese werden aus endokrin aktiven Zellen sezerniert, die über den gesamten Gastrointestinaltrakt verteilt sind. Einige dieser enteralen Peptidhormone, z.B. Gastrin und Somatostatin, sind auch im zentralen Nervensystem nachweisbar, wo sie als Neurotransmitter wirken. Peptide diffundieren aufgrund ihres geringen Molekulargewichts rasch in alle Gewebe mit Ausnahme des Gehirns [REUBI 1997], da die Passage der Blut-Hirn-Schranke

aufgrund der hydrophilen Eigenschaften der Peptide nicht möglich ist [BEHR ET AL. 1999A, BEHR ET AL. 1999B].

Somit ist die Möglichkeit gegeben, dass eine Gruppe von Peptidhormonen unabhängig voneinander in verschiedenen regulatorischen Bereichen wie dem ZNS und dem Gastrointestinaltrakt ihre jeweilige Wirkung entfalten kann [BEHR ET AL. 1999A, BEHR ET AL. 1999B].

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über Vorkommen und Funktion einer Auswahl gastrointestinaler Peptidhormone / Neurotransmitter.

Peptid	Vorkommen (u.a.)	Funktion (u.a.)
Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)	Neurone und Nervenfasern des Intestinaltrakts	Vasodilatation, Relaxation der glatten Muskulatur
Cholezystokinin	Duodenum, Jejunum	Stimulierung der pankreatischen Enzymsekretion
Gastrin	Magenantrum, oberes Duodenum	Stimulierung der HCl-Produktion
Bombesin / Gastrin-releasing Peptide (GRP)	Magen, Duodenum, Jejunum	Pankreassekretion
Substanz P	gesamter Intestinaltrakt	Kontraktion der glatten Muskulatur
Somatostatin	gesamter Intestinaltrakt, Pankreas	Hemmung sekretorischer Vorgänge

Tab.1.1 Beispiele für Vorkommen und Funktion ausgewählter gastrointestinaler Peptidhormone

1.3 Radioaktiv markierte Peptide als Radiopharmazeutika

In der Nuklearmedizin werden mit radioaktiven Substanzen markierte Peptide in der Funktions-, Stoffwechsel- und Lokalisationsdiagnostik sowie der Therapie verschiedener Neoplasien eingesetzt. Peptide, deren Rezeptoren auf den Zielzellen überexprimiert werden, dienen als Trägermoleküle für Radionuklide, die sich auf diese Weise schnell, selektiv und ausreichend lange für den entsprechenden diagnostischen oder therapeutischen Zweck im Zielgewebe anreichern. In anderen Organen und Geweben wird eine möglichst geringe Anreicherung des Radionuklids angestrebt.

Die Mehranreicherung des Radionuklids in der Zielzelle erfolgt durch die Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes im Anschluss an die Bindung des radioaktiv markierten Peptids an den Rezeptor auf der Zelloberfläche. Das Metallion (z.B. ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$) wird in die Zelle aufgenommen und nicht mehr oder nur in geringem Umfang ausgeschieden [MOTTA-HENNESSY ET AL. 1990], während das Peptid hauptsächlich in der Niere metabolisiert wird. Die renale Ausscheidung hat einen unerwünscht hohen Nierenuptake zur Folge. Bei Peptiden mit positiv geladenen Aminosäuren kann der Nierenuptake jedoch durch die Infusion der Aminosäuren Arginin und Lysin deutlich reduziert werden kann. Auf diese Weise werden die tubuläre Reabsorption und die Anreicherung des radioaktiv markierten Peptids im renalen Parenchym reduziert, so dass die Niere vor Gewebeschädigungen geschützt wird [HAMMOND ET AL. 1993].

Das mit ^{111}In markierte Somatostatin-Analogon DTPA-[D-Phe¹]-Octreotid (Octreoscan[®]) war 1994 das erste in Europa und den USA zugelassene radiopharmazeutische Peptid.

Aufgrund der Häufigkeit der (Über-) Expression spezifischer Peptidrezeptoren auf zahlreichen Tumoren werden weitere regulatorische Peptide als potentielle Radiopharmazeutika erforscht und entwickelt. Von großem Interesse sind vor allem das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) und Gastrin. Eine Übersicht über das Vorkommen der entsprechenden Rezeptoren in humanen Tumoren gibt die folgende Tabelle.

Peptid- Rezeptor	Rezeptorvorkommen in Tumoren
VIP-Rezeptor	<ul style="list-style-type: none"> -verschiedene Adenokarzinome (Magen, Colon, Pankreas, Lunge etc.) -kleinzelliges Bronchialkarzinom -neuroendokrine Tumoren (Karzinoide) -Lymphome <p>[VIRGOLINI ET AL. 1994]</p>
Cholezystokinin-2/Gastrin-Rezeptor	<ul style="list-style-type: none"> -medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC) -kleinzelliges Bronchialkarzinom -Ovariakarzinome -Astrozytome -neuroendokrine Tumoren (Karzinoide) -potentiell: gastrointestinale Adenokarzinome (Magen, Colon, Pankreas) <p>[REUBI ET AL. 2002]</p>
Bombesin-Rezeptorsubtypen (GRP-, NMB-, BB3-Rezeptor)	<ul style="list-style-type: none"> -Prostatakarzinom (GRP-R) -Mammakarzinom (GRP-R) -Gastrinome (GRP-R) -intestinale Karzinoide (NMB-R) -Bronchialkarzinoide (BB3-R) <p>[REUBI ET AL. 2002]</p>
Substanz P Rezeptor	<ul style="list-style-type: none"> -medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC) -kleinzelliges Bronchialkarzinom -Mammakarzinom -peri- und intratumorale Gefäße
Somatostatin Rezeptor (SSTR)	<ul style="list-style-type: none"> -neuroendokrine Tumoren (Karzinoide etc.) -kleinzelliges Bronchialkarzinom -medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC) -verschiedene Tumoren des Nervensystems (z.B. Meningeome,

Neuroblastome, Medulloblastome) -Hypophysen-Adenom -Mammakarzinom -Nierenzellkarzinom -Prostatakarzinom -Sarkom -Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome [REUBI ET AL. 1986; REUBI ET AL. 1998B]

Tab.1.2 Vorkommen von Peptid-Rezeptoren in humanen Tumoren

1.3.1 Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)

VIP ist ein gastrointestinales Neuropeptid, das aus 28 Aminosäuren aufgebaut ist. Es hemmt die Magensaftsekretion und die Magen-Darm-Motilität, steigert die Pankreassekretion und den Gallenfluss und ist für die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes von großer Bedeutung [SCHWARTZ ET AL. 1974].

VIP-Rezeptoren werden in nahezu allen humanen epithelialen Tumoren überexprimiert. In verschiedenen klinischen Studien zeigte sich, dass mit Hilfe von ¹²³I markiertem VIP die Mehrzahl intestinaler Adenokarzinome ebenso wie neuroendokrine Tumoren einschließlich der Insulinome dargestellt werden kann [VIRGOLINI ET AL. 1994, VIRGOLINI ET AL. 1995].

Die Entwicklung neuer Radionuklid-gekoppelter, stabiler VIP-Analoga ist auf dem Gebiet der Entwicklung von Radiopeptiden zur Tumordiagnostik und -therapie ein erfolgversprechendes Vorhaben. Hier stellen die Verbesserung der derzeitigen Bildgebungstechnologien und die Weiterentwicklung hin zu optimalen Rezeptorliganden zukünftig eine große Herausforderung dar [BEHR ET AL. 2001A, HESSENIUS ET AL. 2000].

1.3.2 Cholezystokinin und Gastrin

Cholezystokinin (CCK) ist ein in der Duodenalschleimhaut gebildetes Polypeptid, das die Sekretion von Pankreashormonen, die Kontraktion der Gallenblase und die Darmmotilität stimuliert.

Gastrin ist ein Oligopeptid, welches in der Antrumschleimhaut des Magens gebildet wird. Es fördert die Salzsäuresekretion des Magens, die Pepsinogensekretion sowie die Magenmotilität.

CCK und Gastrin gehören der gleichen Peptidfamilie an. Sie vermitteln ihre Wirkung über CCK-1 und CCK-2 Rezeptoren, zu denen sie unterschiedliche Affinitäten aufweisen [KOPIN ET AL. 1992; WANK ET AL. 1994].

CCK-2/Gastrin-Rezeptoren wurden bei Autoradiographie-Studien in mehr als 90% der medullären Schilddrüsenkarzinome [REUBI ET WASER 1996] und zu einem hohen Prozentsatz z.B. auch in kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Ovarialkarzinomen nachgewiesen [REUBI ET AL. 1997A]. An ^{111}In gekoppelte (Mini)Gastrin-Derivate haben in vivo und in vitro sowie in präklinischen Studien eine hervorragende Selektivität für den CCK-2-Rezeptor und starke Anreicherung im entsprechenden Tumorgewebe bei geringer Anreicherung in anderen Organen und Geweben gezeigt. Der Einbau von D-Glu als strukturelle Veränderung der Peptide hat eine verbesserte Bindung an den Chelator DTPA zur Folge. Die Ergebnisse der vorliegenden Studien dokumentieren, dass CCK-2-Rezeptor-Liganden, wie z.B. ^{111}In gekoppeltes DTPA-D-Glu¹-Minigastrin, eine aussichtsreiche neue Klasse an rezeptorbindenden Peptiden darstellen [BEHR ET AL. 1999A; BEHR ET AL. 1999B; BEHR ET AL. 2001B], die in der Diagnostik und Therapie einer Vielzahl von Malignomen eingesetzt werden kann. So sind diese Peptide insbesondere für ein sensibles und zuverlässiges Staging von Patienten mit metastasiertem MTC in Betracht zu ziehen [BEHR ET BEHE 2002].

1.3.3 Bombesin / Gastrin-releasing Peptide (GRP)

Das Peptidhormon Bombesin entstammt den Zellen des APUD (amine precursor uptake and decarboxylation)-Systems und regt die Sekretion von Magensäure, Cholezystokinin und Gastrin an. Es setzt sich aus 27 Aminosäuren zusammen.

Einige Tumoren des zentralen Nervensystems, z.B. Astrozytome und Meningeome, exprimieren zahlreiche hoch-affine Rezeptoren für Bombesin / GRP. Pinski et al. untersuchten aufgrund dessen die Wirkung von Bombesin / GRP-Antagonisten auf das Tumorwachstum sowohl in vivo als auch in vitro. Es wurde ein Rückgang des Tumorwachstums beobachtet, der mit einer signifikanten Downregulation von EGF (endothelial growth factor)-Rezeptoren an der Tumorzelloberfläche assoziiert war. Das Tumorwachstum wurde demnach wahrscheinlich durch Störungen der EGF-Wirkung, -Sekretion oder -Signalübertragung am Rezeptor beeinflusst [PINSKI ET AL. 1994].

1.3.4 Substanz P

Substanz P ist ein Neuropeptid, das sich aus 11 Aminosäuren zusammensetzt und eine Reihe von Funktionen, z.B. im neuroendokrinen System, besitzt. Es stimuliert die glatte Muskulatur des Darms, senkt den Blutdruck durch Vasodilatation und erhöht die Kapillarpermeabilität. Des Weiteren stellt Substanz P neben anderen Transmittern einen Botenstoff des ersten afferenten Neurons dar und ist somit bedeutsam für die Schmerzwahrnehmung. Substanz P-Rezeptoren werden unter anderem von Glia-Tumoren, kleinzelligen Bronchialkarzinomen und medullären Schilddrüsenkarzinomen exprimiert. Vor allem in Gefäßen in und um den Tumor kann eine hohe Dichte an Substanz P-Rezeptoren nachgewiesen werden. Diese könnten der Substanz P-vermittelten Vasodilatation in diesen Geweben dienen.

An DTPA gebundene Substanz P-Derivate wurden synthetisiert und mit ¹¹¹In markiert. Mit Hilfe dieser Radiopeptide ist es möglich, den Thymus von Patienten mit Autoimmunerkrankungen szintigraphisch darzustellen. Die Darstellung von Tumoren mittels Substanz P-Analoga gelang bisher nicht [REUBI 1997; HENNING ET AL. 1994; VAN HAGEN ET AL. 1996].

1.4 Somatostatin

Das natürliche Somatostatin ist ein zyklisches Tetradekapeptid, welches im Hypothalamus sowie im Pankreas und anderen Teilen des Gastrointestinaltraktes gebildet wird. Ebenso wird Somatostatin von aktivierten Zellen des Immunsystems, von Entzündungs- und von Tumorzellen abgegeben. Es wirkt sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem sowie in zahlreichen peripheren Geweben, wie dem Pankreas, dem Magen, den Nieren und Nebennieren, der Schilddrüse, dem Gefäß- und dem Immunsystem [REICHLIN 1983; PATEL 1999]. In Säugetieren kommen Somatostatin 14 und Somatostatin 28 als bioaktive Peptide vor, die sich aus 14 bzw. 28 Aminosäuren zusammensetzen. Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften des Moleküls kann Somatostatin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Als hypothalamisches Inhibiting-Hormon reguliert Somatostatin im zentralen Nervensystem zum Beispiel die Ausschüttung von Wachstumshormon (GH) [BRAZEAU ET AL. 1973, SILER ET AL. 1973] und thyreoideastimulierendem Hormon (TSH) aus dem Hypophysenvorderlappen. Über parakrine Wirkung beeinflusst Somatostatin die Sekretion von Insulin und Glukagon aus dem Pankreas, in dessen D-Zellen es produziert wird. Somatostatin wirkt meist inhibitorisch und reguliert zahlreiche weitere physiologische Funktionen, wie zum Beispiel die Modulation motorischer und kognitiver Prozesse, die Hemmung der Motilität des Magen-Darm-Trakts, der Nährstoffresorption, der Gefäßkontraktilität und der Zellproliferation [REICHLIN 1983; PATEL 1997]. Krenning et al. beschrieben 1993 antiproliferative Effekte von Somatostatin auf bestimmte Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*, die sie auf verschiedene Ursachen zurückführten: hierzu gehören neben der Induktion der SST-Rezeptor-Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen, der Hemmung der GH-Sekretion, der Inhibition der Angiogenese auch Modulationen in der Aktivität des Immunsystems [KRENNING ET AL. 1993A].

In Tabelle 1.3 sind die Aminosäuresequenzen von Somatostatin 14 und 28 sowie Octreotid dargestellt.

Somatostatin 14	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Ser-Ser-Cys-Lys
Somatostatin 28	Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
Octreotid	-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)

Tab.1.3 Aminosäuresequenzen von SST-14, SST-28 und Octreotid

1.5 Somatostatin-Rezeptor

Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften des Moleküls kann Somatostatin die lipophile Zellmembran nicht penetrieren. Somatostatin vermittelt seine Wirkung über G-Proteingekoppelte, hoch-affine Plasmamembran-Rezeptoren. Diese besitzen die für G-Proteingekoppelte Rezeptoren typischen 7 α -Helix Transmembrandomänen [DUTOUR ET AL. 1998; BELL ET AL. 1995, REISINE ET BELL 1995; PATEL 1997]. Der N-Terminus des Rezeptorproteins und die Bindungsstelle für Liganden befinden sich auf der extrazellulären Oberfläche der Membran, der C-Terminus und die Bindungsstelle für G-Proteine sind an der intrazellulären Membranseite lokalisiert.

Somatostatin-Rezeptoren wurden erstmals in GH₄C₁-Zellen der Hypophyse im Rahmen von Bindungsstudien entdeckt und beschrieben [SCHONBRUNN ET TASHJIAN 1978]. In Folgestudien wurde mit Hilfe vielfältiger anderer Techniken, wie zum Beispiel Membran-Bindungs-Analysen und in vivo- und in vitro-Autoradiographie nachgewiesen, dass Somatostatin-Rezeptoren (SSTRs) in unterschiedlicher Dichte in einer Reihe von Organen und Geweben vorkommen [PATEL ET AL. 1990, PATEL ET AL. 1995, REUBI ET AL. 1998A]. Es werden 5 Rezeptor-Subtypen unterschieden (SSTR1-5) [BRUNS ET AL. 1995], die in Abhängigkeit vom Zelltyp nicht nur auf zahlreichen physiologischen, sondern auch neoplastischen Zellen spezifisch exprimiert werden und folglich neue molekulare Ansatzpunkte in der Diagnostik und Therapie bestimmter Tumoren darstellen [REUBI ET AL. 1997B].

Physiologisch kommen SSTRs zum Beispiel im Gehirn, Magen, in der Hypophyse, dem endokrinen und exokrinen Pankreas, den Nieren und Nebennieren, der Schilddrüse und in Zellen des Immunsystems vor [PATEL ET AL. 1990, PATEL ET AL. 1995, REUBI ET AL. 1998A].

Zu den humanen Tumoren, die typischerweise SSTRs (über)exprimieren, zählen neuroendokrine Tumoren (Karzinoide etc.), das kleinzellige Bronchialkarzinom, das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC), verschiedene Tumoren des Nervensystems und Lymphome (Hodgkin-Lymphome, Non-Hodgkin-Lymphome) [REUBI 1997, KRENNING ET AL. 1995].

Das pathologische Vorkommen von SSTRs wurde auch in einigen Tumorzelllinien nachgewiesen. Dazu gehört unter anderem die exokrine Pankreastumor-Zelllinie AR42J [HOFSLI ET AL. 2002].

Die Annahme der Existenz von mehr als einem SSTR wurde erstmals basierend auf dem Nachweis verschieden starker Rezeptor-Bindungen und Wirkungen von SST-14 und SST-28 im Gehirn, der Hypophyse und in Inselzellen formuliert [MANDARINO ET AL. 1981, SRICANT ET PATEL 1981]. Spätere Studien bestätigten und erweiterten diese Beobachtungen hinsichtlich der Erkenntnis, dass nicht nur SST-14- und SST-28-selektive Rezeptoren zu unterscheiden sind, sondern die Bindungsstelle für SST-14 selbst heterogen ist und in Subklassen eingeteilt werden kann, die unterschiedlich empfindlich gegenüber verschiedenen SST- Analoga sind [TRAN ET AL. 1985].

Die 5 humanen SSTR-Gene befinden sich getrennt auf verschiedenen Chromosomen und kodieren Rezeptorproteine, die sich aus 356 bis 391 Aminosäuren (AS) zusammensetzen. Die für die Transmembrandomänen kodierenden Sequenzen weisen die meisten Übereinstimmungen auf (55-70% AS-Sequenz-Identität). Die größten Differenzen zeigen sich in den für die amino- und carboxyterminalen Enden der Proteine kodierenden Sequenzen [PATEL ET AL. 1995, BELL ET AL. 1995]. Insgesamt weisen die Mitglieder der SST-Rezeptor-Familie eine 39-57%ige Identität ihrer AS-Sequenzen auf. Alle SSTR-Isoformen, sowohl die humanen als auch die anderer Spezies, besitzen einen hoch-konservierten Bereich innerhalb der 7. Transmembrandomäne, der eine Erkennungssequenz für die gesamte Rezeptorfamilie darstellt.

Alle 5 Rezeptor-Subtypen binden die natürlichen Peptide SST-14 und SST-28 mit hoher Affinität, wobei SSTR1 – SSTR4 die Peptide in etwa gleich stark binden, während SSTR5 eine 10-15fach höhere Affinität zu SST-28 im Vergleich zu SST-14 zeigt [PATEL 1997, PATEL ET AL. 1995, PATEL ET SRICANT 1994].

Die chemisch modifizierten synthetischen Analoga wie Octreotid, Lanreotid und Vapreotid weisen hingegen oftmals strenge Selektivität für nur einen oder allenfalls einige wenige Rezeptor-Subtypen auf.

Reubi et al. untersuchten ca. 200 humane Tumoren makroautoradiographisch und wiesen nach, dass die überwiegende Mehrheit vorrangig einen bestimmten SST-Rezeptor-Subtyp exprimiert. Die Mehrzahl humaner endokriner Pankreastumoren, wie z.B. Gastrinome, Glukagonome oder Vipome, exprimiert SSTR2. Auch Medulloblastome und Neuroblastome exprimieren in erster Linie SSTR2. Insulinome hingegen weisen vorrangig SSTR3 auf. Inaktive Hypophysen-Adenome exprimieren ebenso überwiegend SSTR3, während bei aktiven, z.B. growth hormone (GH)-sezernierenden Hypophysen-Adenomen SSTR2 und / oder SSTR5 dominieren. Bei Prostata-Karzinomen und Sarkomen überwiegt SSTR1. Die in der Umgebung von Tumoren lokalisierten Venen stellten sich als SSTR2 positiv heraus. Karzinoide, Phäochromozytome, Paragangliome und medulläre Schilddrüsenkarzinome zeigen eine gemischte Verteilung verschiedener SSTR-Subtypen, wobei SSTR2 am häufigsten nachweisbar ist.

Der insgesamt am häufigsten exprimierte SST-Rezeptor-Subtyp in den zahlreichen untersuchten Tumoren ist der SSTR2 [REUBI ET AL. 1997B]. Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung, da SSTR2 den Rezeptor-Subtyp mit der größten Affinität zu den kommerziell erhältlichen synthetischen SST-Analoga, z.B. Octreotide, darstellt. Demzufolge lassen sich mit dem ¹¹¹In-markiertem DTPA-Octreotide SSTR2-exprimierende Tumoren in vivo am zuverlässigsten darstellen und am effektivsten behandeln [REUBI ET AL. 2001].

Einen Überblick über die SSTR-Subtyp-Expression in verschiedenen Tumoren gibt Tab.1.4.

SSTR-positiver Tumor	Fall-Zahl n	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
<u>Tumoren mit SSTR1 Dominanz</u>						
-Prostata-Karzinom	4	+++	-	-	-	-
-Sarkom	6	+++	-	-	-	-
<u>Tumoren mit SSTR2 Dominanz</u>						
-Meningeom	6	-	+++	-	-	-
-Medulloblastom	5	-	+++	-	-	-
-Mamma-Karzinom	29	-	+++	-	-	-
-Lymphom	4	-	+++	-	-	-
-Paragangliom	6	-	+++	-	-	-
-kleinzelliges Bronchial-Karzinom	2	-	+++	-	-	-
<u>Tumoren mit SSTR3 Dominanz</u>						
-inaktive Hypophysen-Adenome	12	-	-	+++	-	-
<u>Tumoren mit SSTR2+SSTR5 Dominanz</u>						
Growth hormon (GH)-produzierende Hypophysen-Adenome	7	-	++	-	-	++

Tab. 1.4 Verteilung von SSTR- Subtypen in verschiedenen Tumoren [aus REUBI ET AL. 2001]

In der folgenden Tabelle sind Resultate von [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotide Szintigraphien neuroendokriner Tumoren den Ergebnissen von in vitro-SSTR-Autoradiographien gegenübergestellt. Die verschiedenen Methoden zeigen die Inzidenz von Somatostatin-Rezeptoren in den untersuchten Tumoren an.

Tumor	In vivo-Szintigraphie		In vitro-Rezeptorstatus	
Karzinoid	69/72	96%	54/62	88%
Gastrinom	12/12	100%	6/6	100%
Insulinom	14/23	61%	8/11	72%
Glukagonom	3/3	100%	2/2	100%
Nichtklassifizierte APUDome	16/18	89%	4/4	100%
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	20/28	71%	10/26	38%
Neuroblastom	8/9	89%	15/23	65%
Phäochromozytom	12/14	86%	38/52	73%
Kleinzelliges Bronchialkarzinom	34/34	100%	4/7	57%
GH-produzierender Hypophysentumor	7/10	70%	45/46	98%

Tab.1.5 Inzidenz von Somatostatin-Rezeptoren in neuroendokrinen Tumoren [AUS KRENNING ET AL. 1993B]

1.6 Funktionsweise G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

G-Proteine übertragen Signale von 7- α -Helix-Rezeptoren auf Effektorproteine. Eine Untereinheit des G-Proteins ist in der Lage, ein Guanin-Nukleotid (GDP oder GTP) zu binden. Die Signaltransduktion in G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird durch die Bindung des jeweiligen Peptids an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors ausgelöst. Hierdurch verändert sich die Rezeptorkonformation in der Art, dass ein G-Protein anlagern kann. Die Wechselwirkung mit dem Rezeptor führt durch den Austausch von GDP gegen GTP zur Aktivierung des G-Proteins. Es trennt sich vom Rezeptor und zerfällt in zwei Einheiten. Die GTP-tragende Untereinheit bindet an ein nachgeschaltetes Effektorprotein und beeinflusst dessen Aktivität: Ionenkanäle werden geöffnet oder geschlossen, Enzyme oder Transportproteine werden aktiviert oder inaktiviert.

1.7 Internalisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Anzahl G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in der Plasma-Membran unterliegt Schwankungen und wird durch verschiedene regulatorische Prozesse beeinflusst. Die Verteilung der Rezeptoren zwischen der Zellmembran und intrazellulären Membranbereichen befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht. Die Synthese der G-Protein gekoppelten Rezeptoren findet im endoplasmatischen Retikulum statt, anschließend werden sie im Golgi-Apparat weiter prozessiert und schließlich zur Zellmembran transportiert und dort integriert.

Die Bindung agonistischer Liganden an den Rezeptor führt neben der Bildung von sekundären Botenstoffen (second messenger) zu Veränderungen der Ansprechbarkeit des Rezeptors, er wird desensibilisiert. Die Desensibilisierung wird häufig von der Internalisation des Rezeptors begleitet. Im Anschluss daran kann der desensibilisierte Rezeptor entweder resensibilisiert und als funktionsfähiger Rezeptor erneut in die Zellmembran integriert werden (Recycling) oder in andere Zellkompartimente überführt und dort abgebaut werden, was zur so genannten „down regulation“ des Rezeptors führt. Darunter versteht man die sinkende Zahl an Bindungsstellen an der Zelloberfläche [TOEWS 2000].

Die Desensibilisierung und die sie begleitende Internalisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wurde bislang für β 2-adrenerge Rezeptoren (β 2ARs) am ausführlichsten beschrieben. Die funktionelle Desensibilisierung der β 2ARs wird in erster Linie durch ein schnelles Abkoppeln des aktivierten G-Proteins vom Rezeptor verursacht, was durch die Phosphorylierung des Rezeptors und die Bindung von β -Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor in der Membran bedingt ist. Die Bindung von β -Arrestin an den desensibilisierten Rezeptoren kann jetzt zur Aufnahme der Rezeptoren in intrazelluläre Vesikel (Endosomen) führen, wo es dann zur Resensibilisierung oder zum Abbau des Rezeptors kommen kann [TOEWS 2000].

Die Internalisierung, die nur auf agonistisch wirkende Rezeptorliganden beschränkt ist [HIPKIN ET AL. 1997], führt zu einer Akkumulation des Peptids in der Zelle. Dies ist im Hinblick auf die diagnostische und therapeutische Anwendung von (Radio-)Peptiden von herausragender Bedeutung.

1.8 Entwicklung und klinische Anwendung von Somatostatin-Analoga

Aufgrund der Tatsache, dass Somatostatin-Rezeptoren in verschiedenen Tumoren überexprimiert werden, stellen sie neue Angriffspunkte sowie die molekulare Grundlage diagnostischer, therapeutischer und radiotherapeutischer Anwendungsmöglichkeiten synthetischer Somatostatin-Analoga dar (Tab. 1.6) [REUBI ET AL. 1998B, BEHR ET AL. 2001A].

Anwendungsart	Beispiel
diagnostisch	in vivo-Visualisierung SST-Rezeptor-positiver Tumoren und ihrer Metastasen mit Hilfe ^{111}In -DTPA-Octreotid (Octreoscan [®])-Szintigraphie
therapeutisch	symptomatische Behandlung SST-Rezeptor-positiver neuroendokriner Tumoren der Hypophyse und des gastroenteropankreatischen Systems mit Hilfe stabiler, nicht radioaktiv markierter SST-Analoga
radiotherapeutisch	Zerstörung SST-Rezeptor-positiven Tumorgewebes mittels ionisierender Strahlung, die durch die Peptide zum Tumor transportiert wird

Tab.1.6 Anwendungsmöglichkeiten synthetischer Somatostatin-Analoga [modifiziert nach REUBI ET AL. 1998B]

Limitierende Faktoren für den klinischen Einsatz von physiologischem Somatostatin sind die sehr kurze Halbwertszeit von SST-14 und SST-28 im Bereich von 1 bzw. 3 Minuten und eine schnelle Clearance aus dem Blut bei intravenöser Applikation. Aufgrund dieser kurzen Halbwertszeit von natürlichem Somatostatin würde lediglich eine kontinuierliche intravenöse Gabe zu therapeutischen Wirkungen führen. Aus diesem Grund werden neue Somatostatin-Analoga synthetisiert, die sich im Vergleich zu den natürlichen Somatostatinen durch eine längere Halbwertszeit und Stabilität gegenüber Serum-Peptidasen auszeichnen sollen. Im Zielgewebe

wird eine ausreichend lange und konzentrierte Anreicherung der Analoga angestrebt. Voraussetzung hierfür ist eine hohe Rezeptor-Affinität und -Spezifität.

Im Anwendungsbereich der Radionuklid-gekoppelten Somatostatin-Analoga ist zugleich ein günstiges Tumor-Hintergrund-Verhältnis erwünscht. Eine minimale Strahlenbelastung umgebender Organe und Gewebe, vor allem der Nieren, soll gewährleistet werden.

Die kurzen synthetischen Somatostatin-Analoga, die beispielsweise zur Behandlung von Patienten mit neuroendokrinen Tumoren zum Einsatz kommen, binden lediglich an SSTR2 und SSTR5 mit (vergleichbar) hoher Affinität, wohingegen die Affinität gegenüber SSTR3 allenfalls moderat und gegenüber SSTR1 und SSTR4 nochmals deutlich geringer ausgeprägt ist [MEYERHOF 1998; BRUNS ET AL. 1995]. In der folgenden Tabelle sind die Affinitätsprofile verschiedener SST-Analoga für die verschiedenen SSTR-Subtypen zusammengefasst.

Peptid	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Somatostatin-28	5,2±0,3	2,7±0,3	7,7±0,9	5,6±0,4	4,0±0,3
Octreotide	>10,000	2,0±0,7	187±55	>1,000	22±6
[DTPA]octreotide	>10,000	12±2	376±84	>1,000	299±50
[In-DTPA]octreotide	>10,000	22±4	182±13	>1,000	237±52
[DOTA]octreotide	>10,000	14±3	27±9	>1,000	57±22
[DTPA, Tyr ³]octreotate	>10,000	3,91	>10,000	>1,000	>1,000
[DOTA, Tyr ³]octreotide	>10,000	14±3	880±324	>1,000	393±84
[Y-DOTA, Tyr ³]octreotide	>10,000	11±2	389±135	>10,000	114±29
[DOTA, Tyr ³]octreotate	>10,000	1,5±0,4	>1,000	453±176	547±160
[Y-DOTA, Tyr ³]octreotate	>10,000	1,6±0,4	>1,000	523±239	187±50

Tab.1.7 Affinitätsprofile verschiedener Somatostatin-Analoga für SSTR1-5; alle Angaben in nM [REUBI ET AL. 2000]

Die Spezifität endogener Somatostatine begründet sich durch die Tatsache, dass diese nur lokal begrenzt produziert werden und der Abbau durch die Ausschüttung von Peptidasen im Gewebe und Blut rasch erfolgt. Durch diese schnelle Inaktivierung werden unerwünschte systemische Wirkungen unterdrückt [PATEL 1999]

Die Injektion synthetischer Somatostatine führt aufgrund der simultanen Aktivierung mehrerer Zielorte zu einer Reihe vielfältiger Effekte (Systemwirkungen).

Voraussetzungen für den Einsatz eines synthetischen Peptids zur in vivo-Szintigraphie oder der therapeutischen Applikation sind eine hohe, im nano- oder subnanomolaren Bereich liegende Affinität zum Rezeptor, eine hohe Spezifität für den Zielrezeptor sowie die metabolische Stabilität des Moleküls. Forschungsziel ist daher die Entwicklung von Analoga, die sich durch diese Eigenschaften auszeichnen.

Die Entwicklung der Somatostatin-Analoga orientiert sich an Ergebnissen von Struktur-Aktivitäts-Studien von SST-14, die gezeigt haben, dass die Aminosäurefolge Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹, Thr¹⁰, die eine β -Faltblatt-Struktur einschließt, von entscheidender Bedeutung für die biologische Aktivität des Moleküls bzw. die Bindung an den Rezeptor ist.

Grundlegende Strategie in der Entwicklung von Somatostatin-Analoga ist daher die Veränderung verschiedener Strukturen des Moleküls, während das entscheidende Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹, Thr¹⁰-Segment erhalten wird, ebenso wie die Disulfidbrücken und Amidbindungen, die für die Stabilität der β -Faltblatt-Struktur dieses Segments von Bedeutung sind [BAUER ET AL. 1982, VEBER ET AL. 1984]. Unter anderem führte das Einfügen von D-Aminosäuren oder Pseudo-Peptidbindungen zu partiellen Stabilisierungseffekten [BEHR ET AL. 2001A]. Auf diesem Weg sind zahlreiche (kurze) Somatostatin-Analoga synthetisiert worden, von denen einige eine längere Halbwertszeit und Rezeptor-Subtyp-Spezifität als SST-14 aufwiesen. Mit Hilfe dieser Erfahrungen gelang es, das Octapeptid-Analogon SMS 201-995 (Octreotide, Sandostatin) als erste klinisch nutzbare Verbindung herauszustellen, die 1983 in die klinische Praxis eingeführt wurde. Durch die in dem 8 Aminosäuren umfassenden Molekül vorgenommenen Modifikationen ist es gelungen, es vor einem frühzeitigen enzymatischen Abbau zu schützen und die Halbwertszeit im Vergleich zu SST-14 30fach zu erhöhen. Seitdem wird Octreotide in der Therapie hormonproduzierender Tumoren der Hypophyse, des Pankreas und des Intestinums eingesetzt [BAUER ET AL. 1982, LAMBERTS ET AL. 1991, LAMBERTS ET AL. 1996]. Octreotide stellt zum Beispiel eine medikamentöse Therapie-Option der Akromagalie dar [LAMBERTS ET AL. 1985], einer ausgeprägten selektiven Vergrößerung der Akren nach dem Wachstumsalter, die durch die Überproduktion von Somatotropin (STH) im Hypophysenvorderlappen (HVL) meist durch HVL-Adenome verursacht wird. Die Reduktion des splanchnikalen und portal-venösen Blutflusses wird in der Behandlung von Ösophagusvarizen genutzt. Lanreotide (BIM23014) und Vapreotide (RC-160) stellen weitere Octapeptid-Analoga von Somatostatin dar.

Octreotid war mit DTPA als Chelator und ¹¹¹In als Radioligand das erste in Europa und den USA zugelassene Radiopeptid und stellt den bedeutendsten Vertreter der SST-analogen

Pharmakotherapeutika dar [LAMBERTS ET AL. 1991, LAMBERTS ET AL. 1996, KRENNING ET AL. 1993A]. Die folgende Abbildung gibt Auskunft über Tumoren und Erkrankungen, die aufgrund einer erhöhten SSTR-Dichte auf der Zelloberfläche mit Hilfe der [¹¹¹In-DTPA-D-Phe]-Octreotide-Szintigraphie darstellbar sind.

<p><u>SSTR-positive neuroendokrine Zellen</u></p> <p><i>Tumoren und Erkrankungen mit erhöhter SSTR-Dichte auf neuroendokrinen Zellen oder aktivierten Leukozyten</i></p>			
<p><u>Adenohypophyse</u></p> <p><i>GH- o. TSH-produzierende Tumoren</i></p>	<p><u>pankreatische Inselzellen</u></p> <p><i>Inselzell-Tumoren</i></p>	<p><u>neuroendokrine Zellen des GI-Traktes</u></p> <p><i>Karziinoide, undifferenzierte neuroendokrine Karzinome</i></p>	<p><u>Broncho-pulmonale endokrine Zellen</u></p> <p><i>kleinzelliges Bronchial-Karzinom, Karzinoid</i></p>
<p><u>endokrine Zellen verschiedener Lokalisation</u></p> <p><i>neuroendokrine Tumoren des Ovars, des Endometriums, der Brustdrüse, der Nieren etc.</i></p>	<p><u>Leptomeninx</u></p> <p><i>Meningeome</i></p>	<p><u>Glia</u></p> <p><i>gut differenzierte Gliatumoren</i></p>	<p><u>aktivierte Leukozyten</u></p> <p><i>Granulome, Lymphome, Autoimmunerkrankungen</i></p>
<p><u>Merkel-Zellen</u></p> <p><i>trabekuläre Karzinome</i></p>	<p><u>C-Zellen der Schilddrüse</u></p> <p><i>medulläres Schilddrüsenkarzinom</i></p>	<p><u>Paraganglien</u></p> <p><i>Paragangliome</i></p>	<p><u>Nebennierenmark</u></p> <p><i>Phaeochromozytom, Neuroblastom, Ganglioneuroblastom</i></p>

Abb.1.1 Tumoren und Erkrankungen mit erhöhter SSTR-Dichte auf neuroendokrinen Zellen oder aktivierten Leukozyten [modifiziert nach LAMBERTS ET AL. 1991]

In Diagnostik und Staging gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren (Karzinoide) ist die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie jeder anderen Methode überlegen [BEHR ET AL. 2001A].

1.9 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel der im Folgenden beschriebenen Arbeit ist die Untersuchung vier neu synthetisierter verschiedener Somatostatin-Analoga in Bezug auf ihre Eigenschaften als potentielle Radiopharmazeutika zur Lokalisationsdiagnostik und Therapie SSTR-exprimierender Neoplasien.

Die Somatostatin-Derivate werden hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an den Chelator Diethyltriamin-pentaessigsäure-dianhydrid (DTPA), der Möglichkeit der Kopplung von ^{111}In an das DTPA-Peptid, der Serumstabilität des Peptid-Nuklid-Komplexes *in vitro*, ihrer Bindung an Somatostatinrezeptoren, der Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe in AR42J-Zellen und ihrer Biodistribution in athymischen Nacktmäusen geprüft, die ein SSTR-exprimierendes subkutanes Rattenpankreaskarzinom der Zelllinie AR42J tragen. Schließlich erfolgt der Vergleich der Resultate mit dem parallel untersuchten ^{111}In markierten Somatostatin-Analogen DTPA-[D-Phe¹]-Octreotid (Octreoscan[®]), dem ersten in Europa und den USA zugelassenen radiopharmazeutische Peptid.

Die vier verschiedenen Somatostatin-Derivate gleichen sich in der für die Bindung an den SSTR entscheidenden Struktur. Unterschiede bestehen innerhalb der restlichen Aminosäuresequenz, in der jeweils Aminosäuren an verschiedenen Stellen ausgetauscht bzw. entfernt wurden. Hierdurch erhofft man sich eine höhere Affinität zu dem spezifischen Rezeptor und eine verbesserte Stabilität der Peptide.

Kapitel 2

MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht zusätzlich ausgewiesen, von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) und der Firma Merck bezogen und nicht weiter aufgereinigt.

Zur Messung der Radioaktivität wurde der Gamma-Counter COBRA II Auto-Gamma der Firma Packard (Groningen, Niederlande) verwendet.

2.1 Kopplung und Markierung

Die vier getesteten Somatostatinderivate wurden von der Firma Bachem synthetisiert und gereinigt. Vor der Kopplung von Diethylentriamin-pentaessigsäure-dianhydrid (DTPA) an die Peptide wurden keine weiteren Reinigungen durchgeführt.

<i>Peptid</i>	<i>Strukturformel</i>	<i>Molekulargewicht (g/mol)</i>
U1	(Lys(Boc) ^{4,9} - Somatostatin 14	1838,14
U2	(Lys(Boc) ^{4,9} ,D-Trp ⁸)- Somatostatin 14	1838,14
U3	(Des-Ala ¹ ,D-Glu ² ,Lys(Boc) ^{4,9} ,D-Trp ⁸)- Somatostatin 14	1839,12
U4	(Des-Lys ⁴ ,Des-Ser ¹³ ,D-Trp ⁸ ,Lys(Boc) ⁹)- Somatostatin 14	1522,77

Tab. 2.1 Strukturformeln der verwendeten Peptide

2.1.1 Kopplung von DTPA an Somatostatin-Derivate

10mg Peptid wurden abgewogen und in 1ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Da der pH-Wert während der Kopplungsreaktion stets im basischen Bereich liegen muss, wurde zu Versuchsbeginn 50 μ l Ethylendiisopropylamin (DIPEA, Base) zugegeben. Nun wurden 10mg cyclisches DTPA (cDTPA) in die Lösung gegeben und eine Stunde inkubiert. Während dieser Zeit wurden regelmäßig mittels einer Pipettierspitze Proben aus der Lösung entnommen und zur pH-Kontrolle auf Lackmuspapier getestet. Bei Abfall des pH-Wertes unter 8 wurde in 20 μ l-Schritten DIPEA zur Einstellung des pH-Wertes zugegeben.

Nach 1 h wurden erneut 10mg cDTPA hinzugefügt und wiederum eine Stunde unter regelmäßiger pH-Kontrolle und ggf. pH-Einstellung inkubiert.

Im Anschluss an diesen zweiten Inkubationszeitraum wurde die Reaktionsflüssigkeit mittels ca. dreistündiger Vakuumzentrifugation bei 70°C in der Speed Vac® SPD 101B der Firma Savant eingedampft. Auf das im Eppendorf-Gefäß zurückgebliebene Pellet wurde jetzt 1ml einer Lösung aus 96% Trifluoressigsäure (TFA), 2% aqua dest. und 2% Thioanisol gegeben und somit die an den reaktiven Peptidteilen befindlichen Schutzgruppen (FMOC/BOC) in einer einstündigen Inkubationszeit entfernt (Entschützung). Anschließend wurde die Lösung für 8-10 Stunden gefriergetrocknet. Das Lyophilisat des entschützten DTPA-gekoppelten Somatostatin-Derivats wurde in 2ml NaAc-Puffer (0,5M; pH5,4) gelöst und mittels Sep-Pac C-18 Kartusche (Waters, Milford, Massachusetts, USA) aufgereinigt. Hierzu wurden die C-18 Kartuschen zunächst mit 2ml Methanol, dann mit 2ml NaAc-Puffer vorgespült und anschließend das in Lösung befindliche Peptid über die Säule geschickt. Nun wurde erst mit 2ml NaAc-Puffer, dann mit 2ml Methanol nachgespült. Die Methanolfraktion, in der sich das DTPA-gekoppelte Peptid befand, wurde auf zwei Eppendorf-Gefäße verteilt und anschließend bei 50°C und Vakuum solange in der Speed Vac zentrifugiert, bis der Alkohol verdampft war. Die Pellets wurden in jeweils 0.5ml NaAc-Puffer gelöst und in einem Eppendorf-Gefäß tiefgefroren gelagert.

Mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC 535 Detector der Firma Bio-Tek Instruments, Remsfeld, Deutschland) erfolgte nun die Aufreinigung der Peptidlösung. Die dort entstandenen Fraktionen wurden in einem UV-Meter untersucht, wobei die Fraktionen mit der höchsten Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=280\text{nm}$ gesucht wurden, da in diesen Fraktionen die höchste Konzentration an Peptid zu erwarten ist.

2.1.2 Peptidmarkierung mit dem Radionuklid Indium-111

Zur Kopplung von $^{111}\text{Indiumchlorid}$ der Firma Malinckrodt (Niederlande) an das zu markierende Peptid wurden $50\mu\text{l}$ NaAc-Puffer mit $10\mu\text{l}$ Peptidlösung in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und $11,1\text{ MBq }^{111}\text{Indiumchlorid}$ zugesetzt. Diese Lösung wurde bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

2.1.3 Qualitätskontrolle der Markierung

An jede Markierung schloss sich eine Qualitätskontrolle mit Hilfe einer Sep-Pak C-18 Kartusche an. Die Kartuschen wurden konditioniert, indem sie zunächst mit 2ml Methanol, dann mit 2ml NaAc-Puffer durchspült wurden. Nach Zugabe von $5\mu\text{l}$ der Peptid-Indium-Lösung auf die Säule wurde diese jetzt mit 2ml NaAc-Puffer und anschließend mit 2ml Methanol durchspült und beide Fraktionen in getrennten Reagenzröhrchen aufgefangen. Auf diese Weise wurden das ungebundene Indium (in der Pufferlösung) und das markierte Peptid (in der Methanolfraktion) voneinander getrennt. Die verwendete Kartusche wurde in ein drittes Reagenzröhrchen gegeben. Die drei Röhrchen wurden nun am Bohrlochmessplatz untersucht. Der im Filter verbliebene Aktivitätsanteil wurde der markierten Peptidfraktion angerechnet.

Berechnung des Anteils an $^{111}\text{Indium}$ -markiertem Peptid:

$$\frac{\text{Aktivität [cpm] Methanolfraktion + Filter}}{\text{Aktivität [cpm] Pufferfraktion + Methanolfraktion + Filter}} \times 100 = \% \text{ markiertes Peptid}$$

2.2 Überprüfung der Serumstabilität

Ziel dieses Versuchsabschnittes ist es, Hinweise auf das Verhalten der zu testenden Substanzen in humanem Blut zu erlangen. Zur Testung der Serumstabilität der ¹¹¹Indium-markierten Somatostatin-Derivate wurden gesunden Probanden 7ml (1 Serumröhrchen) venöses Blut entnommen und 10min bei 3000U/min zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und 2ml davon mit dem Indium-markierten Peptid (10µl Peptid- Lösung + 100µl NaAc-Puffer + 1,85 MBq ¹¹¹Indium) versetzt. Nach 5minütiger Inkubation bei 37°C wurden 20µl dieser Lösung auf eine zuvor vorbereitete PD10-Säule der Firma GE Healthcare (Little Chalfont, Großbritannien) gegeben. Die Equilibrierung der PD10-Säule erfolgte zuvor durch den Durchlauf von 25ml NaAc-Puffer. Anschließend wurde NaAc-Puffer über die Säule gegeben. Die nach Passage der PD10-Säule austretenden Tropfen wurden zu diesen festgelegten Zeitpunkten in jeweils 20 Fraktionen á 13 Tropfen in Reagenzgläsern gesammelt: nach 5min, 15min, 30min, 1h, 2h, 4h sowie 24h.

Die gesammelten Fraktionen wurden in chronologischer Reihenfolge am γ - Counter gemessen.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinie und Kultur

Die Versuche wurden mit der exokrinen Pankreastumorzelllinie der Ratte AR42J durchgeführt. Diese adhärent wachsenden Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Firma PAA, Österreich) unter Zusatz von 10% fetal calves serum (FCS, Firma PAA), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% BME-Vitaminen in 550ml Zellkulturflaschen kultiviert und bei 37°C in einer mit 5% CO₂ angereicherten Luft in einem Brutschrank der Firma Heraeus aufbewahrt. Ein kompletter Wechsel des Nährmediums erfolgte alle 2 Tage. Bei ca. 60-70%iger

Konfluenz erfolgte die Subkultivierung der Zellen unter sterilen Bedingungen an einer Workbench der Firma Heraeus. Hierzu wurde zunächst das Medium aus der Flasche abgesaugt, 5ml 1fach Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und für 5min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die nun abgelösten Zellen wurden in ein Einmalröhrchen pipettiert, mit 10ml frischem Medium versetzt und 3min bei 1200 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das verbliebene Zellpellet in 10ml frischem Medium gelöst. Die Passage erfolgte im Verhältnis 1:4.

2.3.2 Internalisierung der Peptide in AR42J- Zellen

Die zu testenden Peptide (sowie Octreoscan® zum Vergleich) wurden gemäß dem in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Standardprotokoll mit ¹¹¹Indium markiert und inkubiert sowie anschließend der in Kapitel 2.1.3 geschilderten Qualitätskontrolle unterzogen.

Die AR42J- Zellen wurden drei Tage vor Versuchsbeginn in 6-Well-Platten ausgesät, nach zwei Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. In jedem Well befanden sich ca. 1×10^5 Zellen. Zunächst wurden die zwei 6-Well-Platten in 4 Gruppen (I bis IV) á 3 Wells eingeteilt. Aus jedem Well wurde das Medium abgesaugt und anschließend mit 1ml „phosphate buffered saline“ (PBS, 1:10 verdünnt, pH7,2) gewaschen. Als Reaktionsmedium diente DMEM unter Zusatz von 1% bovinem Serumalbumin (BSA), wovon in jedes Well 1ml gegeben wurde. In die Wells der Gruppen III und IV wurde als Blocksubstanz unmarkiertes Somatostatin-14 in einer Konzentration von 1×10^{-6} M zugegeben. Nach Zugabe von annähernd 1×10^6 cpm ¹¹¹Indium-markierten Peptides in jedes Well wurde bei 37°C für 20min inkubiert. Die Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe wurde so initiiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde nach Absaugen des Überstandes aus allen Wells den Gruppen I und III je 1ml PBS, den Gruppen II und IV je 1ml saurer NaAc-Puffer (0,05M; pH3) zugesetzt (Abb.2.1). Das PBS diente dabei der Entfernung nicht-rezeptorgebundener Aktivität von den Zellen, der saure NaAc-Puffer löste die nicht-internalisierten Rezeptor-Ligand-Bindungen an der Zelloberfläche.

Gruppe	I	II	III	IV
Behandlung	PBS-Waschung	NaAc-Puffer-Waschung	PBS-Waschung + Rezeptorblockung	NaAc-Puffer-Waschung + Rezeptorblockung

Abb 2.1 Behandlung der Proben in den Gruppen I-IV

Um die Internalisierung zu stoppen wurde dann für 6min auf Eis inkubiert und anschließend jedes Well mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen. Zur Zellyse wurde nun 1ml 1M Natriumhydroxid-Lösung in jedes Well gegeben. Das Zellysate aus jedem einzelnen Well wurde dann in Reagenzröhrchen überführt und im γ -Counter gemessen. Zur Auswertung wurde der Mittelwert (MW) der jeweiligen Gruppe gebildet, die Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe errechnete sich dann nach folgender Formel:

$$\frac{\text{MW Gruppe II (NaAc heiß)} - \text{MW Gruppe IV (NaAc heiß + Block)}}{\text{MW Gruppe I (PBS heiß)} - \text{MW Gruppe III (PBS heiß + Block)}} \times 100 = \% \text{ Internalisierung}$$

Alle verwendeten Reagenzien wurden am Versuchstag neu hergestellt.

2.4 Tierversuche

Die Experimente wurden an athymischen Nacktmäusen durchgeführt und dienten der in vivo-Bestätigung der Resultate des Peptiduptakes der AR42J-Zellen aus den Internalisierungsversuchen.

Durch die subkutane Injektion von ca. 1×10^6 AR42J-Zellen aus einer in vitro-Zellkultur wurde das Wachstum eines Tumors induziert, welcher nach 4-6 Wochen deutlich abgrenzbar sichtbar war.

Die zu testenden Substanzen wurden wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben mit 5,55 MBq $^{111}\text{Indium}$ markiert, anschließend folgte die Qualitätskontrolle mit der C18-Säule nach dem in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Vorgehen. 3,7 MBq der markierten Substanz wurden dann in 1ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Jedem Versuchstier wurden 100 μ l dieser Lösung (entsprechend 0,37 MBq) in die Schwanzvene injiziert. Zu den Zeitpunkten $t=\{1\text{h}, 4\text{h}, 24\text{h}\}$ wurden jeweils drei

Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden Herz, Lunge, Milz, Pankreas, Magen, Leber, Nieren, Nebennieren, Dünndarm, Muskel, Knochen und der Tumor freipräpariert und entnommen. Zur Entnahme von Blut wurde die Aorta angeschnitten und das austretende Blut mit Hilfe eines 0,075g fassenden Kapillarröhrchens aufgefangen. Vor Messung des Peptid-Uptakes im γ -Counter wurde das Gewicht der entnommenen Organe und Gewebe bestimmt. Zusätzlich wurde die Aktivität von drei Standardproben, jeweils 10 μ l (entspr. 10%) der in die Schwanzvene injizierten Lösung, bestimmt. Der Mittelwert der in diesen Standards gemessenen Aktivität wurde mit dem Faktor 10 multipliziert, um schließlich die injizierte Gesamtaktivität zu errechnen.

Zur Darstellung der Resultate wurde die von den entnommenen Organen und Geweben aufgenommene Aktivität als prozentualer Anteil der injizierten Dosis pro Gramm Organgewicht berechnet:

$$\frac{\text{Uptake des Organs [cpm]}}{(\text{Mittelwert Standard} \times 10 \text{ [cpm]}) \times \text{Organgewicht}} \times 100 = \% \text{ injizierte Dosis/g}$$

RESULTATE

3.1 Qualitätskontrollen der Indium-111 markierten Octreotid-Analoga

Mit Hilfe von Sep-Pak C-18 Kartuschen wurden im Anschluss an jede Markierung Qualitätskontrollen durchgeführt. Die Aktivität der dabei gewonnenen Natriumacetat- und Methanolfractionen wurde am Bohrlochmessplatz bestimmt. Der im Filter gemessene Anteil der Aktivität wurde der Methanolfraction und somit der markierten Peptidfraction angerechnet. Für die ermittelten Messwerte wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Für Anwendungen wird ein Markierungsanteil von über neunzig Prozent verlangt, der im Mittel bei allen untersuchten Peptiden erreicht wurde. Die Markierungsanteile lagen bei U1 und U2 auf gleichem Niveau bei 95,5% mit Standardabweichungen von 5,2% bei U1 und 4,7% bei U2. Das Peptid U3 wies mit durchschnittlich 91,6% den geringsten Markierungsanteil bei der gleichzeitig größten Standardabweichung von 9% auf. Die Werte der markierten Anteile lagen für U4 bei $93,9 \pm 7,2\%$ (Tab.3.1).

Peptid	freies Nuklid [%]	Peptidkomplex [%]	Standardabweichung [%]
U1	4,5	95,5	$\pm 5,2$
U2	4,5	95,5	$\pm 4,7$
U3	8,4	91,6	± 9
U4	6,1	93,9	$\pm 7,2$

Tab. 3.1 Markierungsergebnisse

3.2 Serumstabilitätsprofile

Die markierten Somatostatin-Derivate wurden zur Überprüfung der Serumstabilität in humanem Serum gesunder Spender für 5 Minuten inkubiert. Diese Lösung durchläuft nun zusammen mit Natriumacetat- Puffer eine zuvor equilibrierte PD10-Säule. Die nach Passage dieser Gelfiltrations-Säule austretenden Tropfen werden in Fraktionen á 20 Tropfen gesammelt und in chronologischer Reihenfolge am γ -Counter gemessen. Aus den Messwerten ergibt sich ein Kurvenverlauf, der einen zunehmenden Anteil an stabilem markiertem Peptid zeigt. Die Stabilität des Peptid-Nuklid-Komplexes nimmt im Zeitverlauf ab, da das Nuklid die Kopplung an den Chelator zunehmend verliert und stattdessen an Serumproteine bindet. Beim Durchlaufen der PD10-Säule werden die großen, schweren Proteine des Serums, an die jetzt ein Teil der Aktivität gebunden ist, von den kleineren, leichteren Peptiden getrennt. Tab.3.2 zeigt die Zeitabhängigkeit des prozentualen Anteils der stabilen Peptid-Nuklid-Komplexe im Serum an der injizierten Gesamtdosis.

<i>Zeit (min)</i>	<i>¹¹¹In-DTPA-U1</i>	<i>¹¹¹In-DTPA-U2</i>	<i>¹¹¹In-DTPA-U3</i>	<i>¹¹¹In-DTPA-U4</i>
5	97,27	62,21	93,62	98,56
30	83,99	55,98	85,53	66,67
60	79,15	51,74	85,81	65,00
120	78,34	58,30	95,22	57,17
240	79,38	62,73	91,80	60,74
1440	88,04	83,42	93,09	75,23

Tab.3.2 Anteil stabiler Peptid-Nuklid-Komplexe im Serum [%]

Bei allen getesteten ¹¹¹In-DTPA-Peptiden zeigte sich anfänglich ein Rückgang der im Serum zirkulierenden stabilen Peptid-Nuklid-Komplexe. Im weiteren Zeitverlauf ist jeweils ein Anstieg des prozentualen Anteils der stabilen Komplexe zu beobachten.

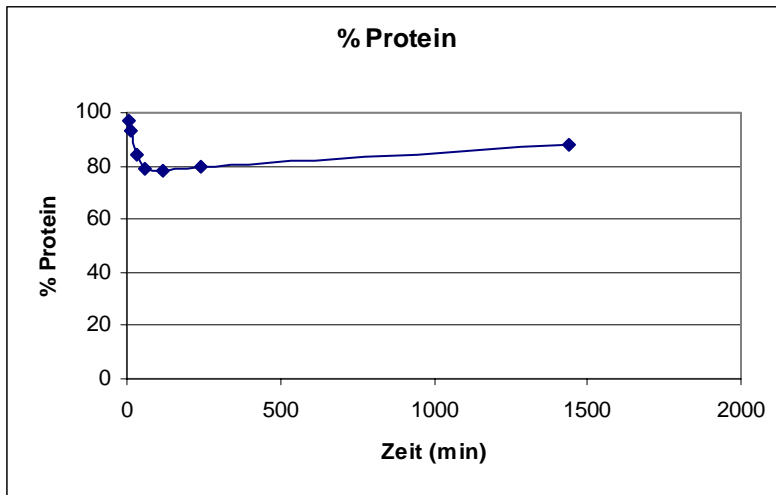


Abb. 3.1 Serumstabilität von ¹¹¹In-DTPA-U1 [%]

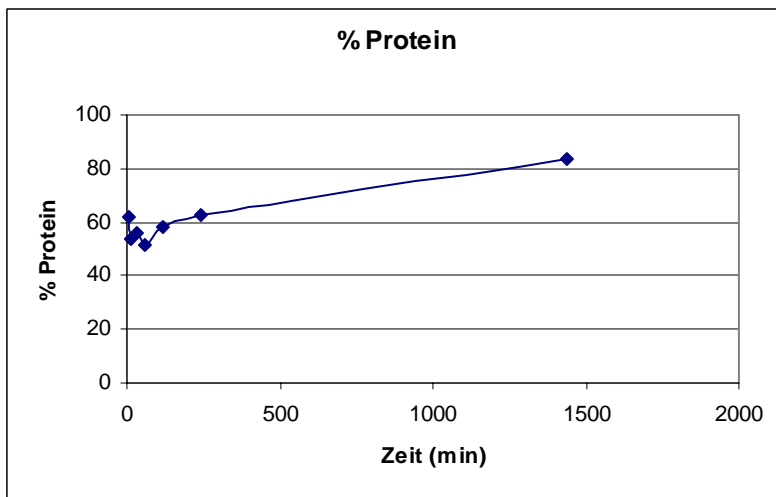


Abb. 3.2 Serumstabilität von ¹¹¹In-DTPA-U2 [%]

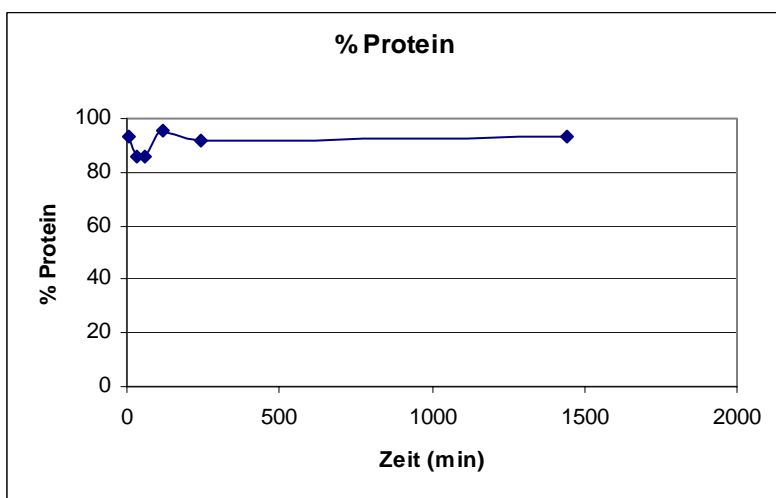


Abb. 3.3 Serumstabilität von ¹¹¹In-DTPA-U3 [%]

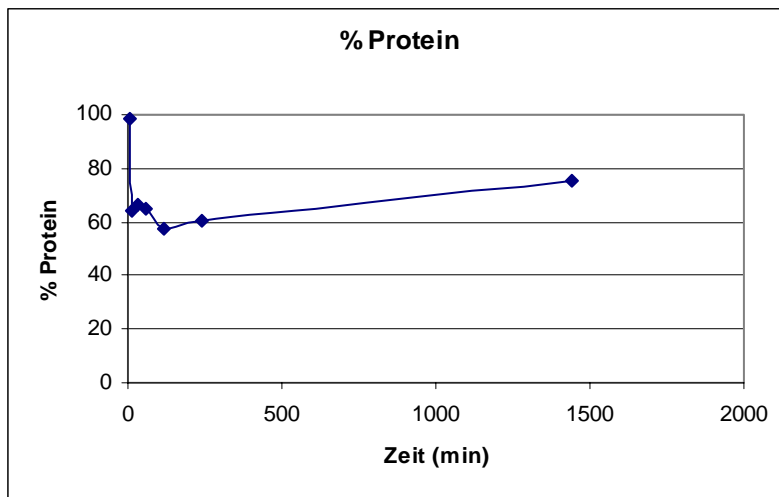


Abb. 3.4 Serumstabilität von ^{111}In -DTPA-U4 [%]

Zu Beginn der Serumstabilitätsprüfungen waren die markierten Peptide U1, U3 sowie U4 zu über 90% stabil. Die höchste Stabilität zu Versuchsbeginn zeigte ^{111}In -DTPA-U4 mit einem Anteil von 98,6%, vergleichbar mit der für ^{111}In -DTPA-U1 gemessenen Stabilität von 97,3%. Für ^{111}In -DTPA-U2 zeigte sich ein deutlich geringerer Anteil von 62,2% an stabilen Peptid-Nuklid-Komplexen zu Versuchsbeginn. Im Versuchsverlauf fällt der Anteil an stabilen Peptid-Nuklid-Komplexen bei allen getesteten Substanzen zunächst deutlich ab und steigt anschließend wieder an.

Zum letzten Messzeitpunkt, 24 Stunden nach Versuchsbeginn, zeigte sich bei ^{111}In -DTPA-U1 ein Anteil von 88,04% stabilen Peptides. Mit 83,4% lag die am Versuchsende gemessene Stabilität von ^{111}In -DTPA-U2 oberhalb des zu Beginn gemessenen Wertes. Nach vierundzwanzig Stunden konnte bei ^{111}In -DTPA-U3 mit 93,1% annähernd die Stabilität wie zu Versuchsbeginn beobachtet werden. Der geringste Anteil an stabilem Peptid-Nuklid-Komplex am Ende der Messreihe zeigte sich mit 75,2% bei ^{111}In -DTPA-U4.

Das untersuchte Peptid ^{111}In -DTPA-U3 ist während des gesamten Versuchsablaufs stets zu über 85% stabil. Neben den konstantesten Anteilen an stabilen Komplexen ist auch die bei Abschluss des Versuchs gemessene Serumstabilität im Vergleich am höchsten.

3.3 Zellversuche

Diese Versuche sollten nachweisen, dass die Peptid-Nuklid-Komplexe spezifisch an die Rezeptoren auf der Oberfläche der AR42J-Zellen binden und anschließend aktiv in die Zellen internalisiert werden. Dies sind Voraussetzungen eines möglichen diagnostischen und therapeutischen Einsatzes der Peptide.

Somatostatin bindet als regulatorisches Peptid an die extrazelluläre Domäne des G-Proteingekoppelten Rezeptors und führt über eine Reihe von Folgeschritten schließlich zur Öffnung oder Schließung von Ionenkanälen. Wird der Rezeptor mit dem daran gebundenen agonistischen Liganden internalisiert, erfolgt eine Inaktivierung der ablaufenden Prozesse. Anschließend kann der Rezeptor entweder erneut in die Zellmembran integriert (recycelt) oder einem enzymatischen Abbau unterzogen werden. Das Peptid verbleibt innerhalb der Zelle [BEHR ET AL. 1999].

Tab.3.3 zeigt ein Beispiel für das Resultat eines Internalisierungsversuches des markierten Peptids U2.

Probe	PBS- heiß	NaAc- heiß	PBS- geblockt	NaAc- geblockt
1	2064	1731	576	1031
2	1948	1940	611	1108
3	1874	2026	708	1329
Mittelwert	1962	1899	632	1156
Standardabweichung	96	152	68	155

Tab.3.3 Internalisierungsversuch mit ¹¹¹In-U2 (Beispiel); Angaben in counts/0,1min; Konzentration der Blocksubstanz 1 x 10⁻⁶M

Durch Anwendung der Formel

$$\frac{\text{MW (NaAc heiß)} - \text{MW NaAc heiß + geblockt}}{\text{MW (PBS heiß)} - \text{MW (PBS heiß + geblockt)}} \times 100 = \% \text{ Internalisierung}$$

lässt sich der Anteil des internalisierten Peptids berechnen. In diesem Versuch wurde das markierte Peptid zu 55,9% internalisiert.

Die nach 20 Minuten Inkubationszeit bestimmte Internalisierungsrate lag bei U2 mit durchschnittlich 45% am höchsten. Allerdings war die Inhomogenität der Ergebnisse mit einer Standardabweichung von $\pm 29,6\%$ erheblich.

U3 zeigte nach 20 Minuten Internalisierungswerte von $37 \pm 14,8\%$.

Die Peptide U1 und U4 erreichten nach Ablauf der Inkubationszeit vergleichbare Internalisierungswerte von 26% bzw. 29%. Die Heterogenität der Messwerte war jedoch bei U4 mit einer Standardabweichung von $\pm 9,7\%$ wesentlich größer. U1 zeigte konstante Internalisierungsraten, die Standardabweichung betrug $\pm 0,4\%$.

Zum Vergleich wurde ein Internalisierungsversuch mit Octreoscan® durchgeführt. Es ergab sich eine Internalisierungsquote von $83,6 \pm 2,6\%$. Octreotid wird demzufolge im Vergleich zu den getesteten Analoga bedeutend besser internalisiert.

Abb. 3.5 gibt einen Überblick über die Internalisierungswerte der Peptid- Nuklid- Komplexe in AR42J- Zellen.

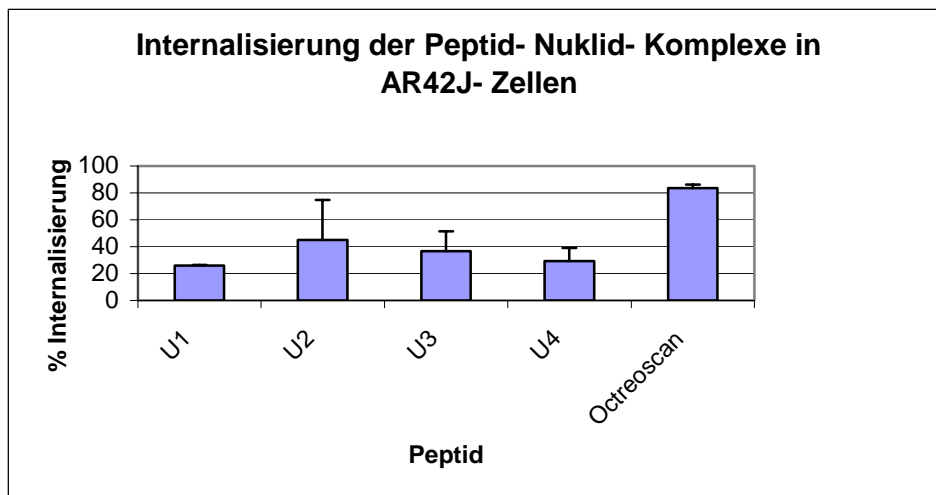


Abb.3.5 Anteil der internalisierten an der spezifisch gebundenen Aktivität, Vergleich mit Octreoscan® [%]

3.4 Biodistribution

Die Experimente zur Untersuchung der Biodistribution der verschiedenen Somatostatinanaloga dienen dem Nachweis einer signifikanten Anreicherung der ^{111}In -markierten Peptide im Tumorgewebe und zugleich der Darstellung der Verteilung der injizierten Dosis in den gesunden Organen und Geweben. Ziel von Tumordiagnostik und –therapie ist eine hohe Anreicherung der Substanz im Tumor bei geringer Belastung gesunder Organe und Gewebe. Mit dem Somatostatin-Derivat U4 wurden diese Versuche aufgrund der unzureichenden Resultate der Serumstabilitätsversuche und der Ergebnisheterogenität der Internalisierungs-Studien bei AR42J-Zellen nicht durchgeführt.

Zunächst wurde die Bioverteilung der Somatostatin-Derivate U1, U2 und U3 vier Stunden post injectionem untersucht. Den Versuchstieren wurden die zu untersuchenden Organe entnommen und die aufgenommene Aktivität am γ -Counter bestimmt. Um den Anteil der injizierten Gesamtdosis pro Gramm (% injiz. Dosis/g) berechnen zu können, wurden die Organe einzeln abgewogen. Pro Messzeitpunkt und zu testender Substanz wurden drei Mäuse untersucht.

3.4.1 Biodistribution von U1, U2 und U3 nach 4 Stunden

Die folgenden Werte beziehen sich auf Mittelwert und Standardabweichung und sind als Prozent der injizierten Gesamtdosis pro Gramm Organgewicht definiert.

Bei allen Versuchstieren konnte nach einem Intervall von vier Stunden nach Injektion die höchste Anreicherung an Aktivität in den Nieren nachgewiesen werden. Das Somatostatinanalogon U3 wies den mit Abstand höchsten Nierenuptake mit $50,18 \pm 18,45\%$ injiz. Dosis/g auf. Die erhebliche Standardabweichung lässt sich erklären, da eine Maus eine ca. doppelt so hohe Nierenaktivität im Vergleich zu den anderen beiden Versuchstieren zeigte.

Das Peptid U2 zeigte nach vier Stunden einen Nierenuptake von $23,23 \pm 7,48\%$ injiz. Dosis/g. Die geringste Aktivitätsanreicherung in den Nieren zeigte sich bei U1 mit durchschnittlich $14,02\%$ injiz. Dosis/g bei einer Standardabweichung von $\pm 4,48\%$.

Das SSTR-exprimierende Pankreas- und Magenparenchym zeigte entgegen den Erwartungen geringe Aktivitätsanreicherungen bei allen Peptiden. Der Pankreas- sowie der Magenuptake waren nur in geringem Maße höher als der Uptake der umgebenden Organe.

Für die Leber als Metabolisierungsorgan konnten keine signifikanten Unterschiede der Aktivitätsanreicherung im Vergleich zu anderen Organen gezeigt werden.

Die Nebennieren zeigten bei U1 einen im Durchschnitt erhöhten Uptake von 1,01% injiz. Dosis/g. Dieser Messwert ist auf die um ein Vielfaches erhöhte Nebennierenaktivität bei einem Versuchstier zurückzuführen. So erklärt sich auch die Standardabweichung von $\pm 0,92\%$. Die zwei anderen Versuchstiere wiesen wesentlich geringere Aktivitätsanreicherungen in den Nebennieren auf, so dass es sich wahrscheinlich um einen Messfehler handelt. Auch für die markierten Peptide U2 und U3 konnten keine vermehrten Anreicherungen an Aktivität in den Nebennieren nachgewiesen werden.

Der Uptake im Muskelgewebe war bei U1 mit 0,63% injiz. Dosis/g etwas erhöht. Dieser erhöhte Wert ist durch die mehr als zehnfache Aktivität in der Muskelprobe einer Maus bedingt, was auch zu einer Standardabweichung von $\pm 0,88\%$ führt. Für U2 und U3 ließen sich keine erhöhten Aktivitäten im Muskel nachweisen.

Die Organe Herz, Blut, Lunge, Milz, Darm und Knochen zeigten vier Stunden nach Injektion bei keinem der getesteten Somatostatin-Analoga eine erhöhte Anreicherung an Aktivität.

Für den an der Hinterflanke lokalisierten SSTR-exprimierenden Tumor konnte bei U1 nach vier Stunden ein Uptake von $1,07 \pm 0,05\%$ injiz. Dosis/g dokumentiert werden, so dass eine vermehrte Anreicherung an Aktivität im Vergleich zum umgebenden Gewebe erfolgt ist. Die erwünschte Anreicherung im Tumor konnte bei den markierten Peptiden U2 und U3 nicht erzielt werden. Der Tumoruptake zeigte hier keinen signifikanten Unterschied zu den anderen Organen.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tab. 3.4 sowie in Abb. 3.6 dargestellt.

Organ	U1		U2		U3	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Herz	0,05	0,03	0,04	0,01	0,03	0,02
Lunge	0,09	0,06	0,06	0,004	0,06	0,04
Milz	0,11	0,04	0,05	0,01	0,05	0,03
Pankreas	0,19	0,08	0,44	0,13	0,09	0,06
Magen	0,30	0,06	0,36	0,01	0,10	0,06
Leber	0,09	0,09	0,06	0,05	0,23	0,03
Nieren	14,02	4,48	23,23	7,48	50,18	18,45
Nebennieren	1,01	0,92	0,19	0,03	0,14	0,07
Darm	0,14	0,03	0,08	0,02	0,08	0,03
Muskel	0,63	0,88	0,03	0,02	0,02	0,01
Knochen	0,30	0,29	0,05	0,02	0,05	0,04
Tumor	1,07	0,05	0,26	0,02	0,14	0,15

Tab. 3.4 Bioverteilung der markierten Peptide U1, U2 und U3 nach 4 Stunden [% injiz. Dosis / g]

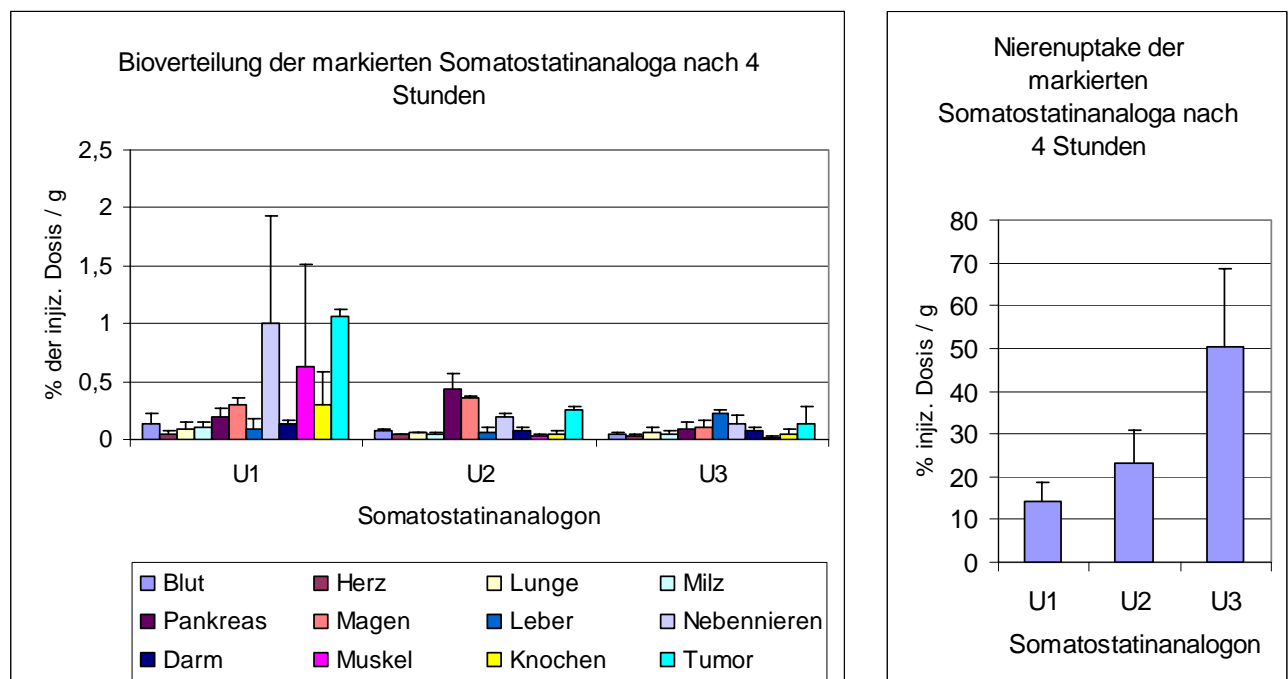


Abb.3.6 Bioverteilung der markierten Somatostatin- Analoga nach 4 Stunden [% injiz. Dosis / g]

Da das Peptid U1 mit einem geringen Nieren-Uptake und dem im Vergleich besten Tumor-Uptake die günstigste Bioverteilung nach vier Stunden aufwies, schlossen sich Untersuchungen der Biodistribution dieses Peptids nach einer und vierundzwanzig Stunden an.

3.4.2 Biodistribution von U1 nach 1, 4 und 24 Stunden

Anhand dieser Versuchsreihe lässt sich das Bindungsverhalten des Peptid-Nuklid-Komplexes im Zeitverlauf beobachten.

Das Octreotidanalogen U1 zeigte in der Niere einen Anstieg der Aktivität von $11,31 \pm 2,48\%$ injiz. Dosis/g nach einer Stunde auf $14,02 \pm 4,48\%$ injiz. Dosis/g nach vier Stunden. Die Messung des Nierenuptakes nach vierundzwanzig Stunden zeigte einen Abfall der gemessenen Aktivität auf $7,06 \pm 1,38\%$ injiz. Dosis/g.

Nach einer Stunde konnte mit $0,34 \pm 0,18\%$ injiz. Dosis/g nur eine geringe Anreicherung an Aktivität im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Nach vier Stunden zeigte sich die größte Aktivitätsanreicherung im Tumor mit $1,07 \pm 0,05\%$ injiz. Dosis/g. Am Versuchsende war jedoch mit $0,18 \pm 0,04\%$ injiz. Dosis/g ein Abfall des Tumoruptakes unterhalb des Messwertes nach einer Stunde zu verzeichnen.

Magen und Pankreas nahmen als SSSTR-positive Gewebe in geringem Umfang mehr Aktivität als die umgebenden Organe auf. Die Aktivitätsanreicherung im Pankreasgewebe betrug nach einer Stunde $0,24 \pm 0,09\%$ injiz. Dosis/g. Nach vier Stunden sank sie auf $0,19 \pm 0,08\%$ injiz. Dosis/g. Vierundzwanzig Stunden nach Injektion lag sie schließlich bei $0,16 \pm 0,06\%$ injiz. Dosis/g. Der Magenuptake betrug zu Beginn $0,35 \pm 0,09\%$ injiz. Dosis/g, fiel nach vier Stunden auf $0,3 \pm 0,06\%$ injiz. Dosis/g und lag am Ende des Versuches bei einem Wert von durchschnittlich $0,19 \pm 0,16\%$ injiz. Dosis/g.

Für die Nebennieren konnte ein leicht erhöhter Uptake gezeigt werden. Er betrug nach einer Stunde $0,42 \pm 0,12\%$ injiz. Dosis/g. Nach vier Stunden lag er bei $1,01 \pm 0,92\%$ injiz. Dosis/g. Vierundzwanzig Stunden nach Injektion wurde eine durchschnittliche Anreicherung von $0,6\%$ injiz. Dosis/g bei einer Standardabweichung von $\pm 0,23\%$ verzeichnet.

Die Organe Herz, Blut, Lunge, Milz, Darm und Knochen verhielten sich bezüglich der Anreicherung und der Ausscheidung ähnlich. Sie zeigten zu keinem Messzeitpunkt eine vermehrte Aktivitätsanreicherung.

Die Ergebnisse sind in Tab. 3.5 und in Abb. 3.7 dargestellt.

Organ	U1 (1h)		U1 (4h)		U1 (24h)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Blut	0,21	0,06	0,14	0,08	0,06	0,02
Herz	0,10	0,03	0,05	0,03	0,03	0,01
Lunge	0,23	0,07	0,09	0,06	0,05	0,02
Milz	0,08	0,03	0,11	0,04	0,07	0,00
Pankreas	0,24	0,09	0,19	0,08	0,16	0,06
Magen	0,35	0,09	0,30	0,06	0,19	0,16
Leber	0,13	0,04	0,09	0,09	0,06	0,01
Nieren	11,31	2,48	14,02	4,48	7,06	1,38
Nebennieren	0,42	0,12	1,01	0,92	0,60	0,23
Darm	0,11	0,03	0,14	0,03	0,07	0,01
Muskel	0,07	0,05	0,63	0,88	0,04	0,01
Knochen	0,14	0,09	0,30	0,29	0,32	0,09
Tumor	0,34	0,18	1,07	0,05	0,18	0,04

Tab. 3.5 Bioverteilung des Somatostatin Analogons U1 nach 1, 4 u. 24 Stunden [% injiz. Dosis/ g]

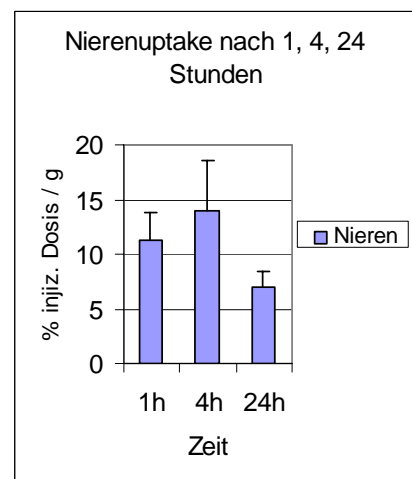
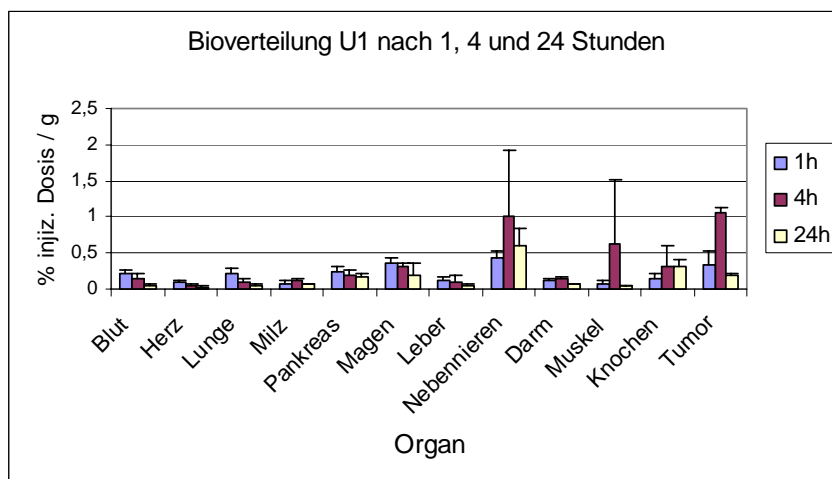


Abb. 3.7 Bioverteilung des markierten Peptids U1 nach 1, 4 und 24 Stunden [% injiz. Dosis / g]

3.4.3 Biodistribution der verschiedenen Octreotid-Analoga

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Untersuchung der Bioverteilung deutliche Unterschiede bezüglich des Bindungsverhaltens der Octreotid-Analoga U1, U2 und U3 an SSSTR-exprimierende Organe und Gewebe nachgewiesen werden konnten. Dies lässt sich vor allem durch die im Tumorgewebe gemessene Aktivität veranschaulichen. Auch Magen und Pankreas als physiologisch SSSTR-positive Organe zeigen Unterschiede in der Aktivitätsanreicherung. Organe ohne SSSTR-Rezeptor-Expression wie z.B. Herz, Lunge oder Knochen zeigen hingegen bei allen Versuchsreihen die erwartungsgemäß geringen Aufnahmen an Aktivität. Der höchste Uptake war bei allen getesteten Substanzen in den Nieren zu messen, da diese als Ausscheidungsorgane dienen. Es zeigten sich jedoch zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Octreotid-Analoga hinsichtlich des Nierenuptakes nach vier Stunden. In Bezug auf die Anreicherung im Tumor erwies sich das markierte Peptid U1 am günstigsten. Gleichzeitig konnte hier der durchschnittlich geringste Nierenuptake nachgewiesen werden.

DISKUSSION

4.1 Diagnostische und therapeutische Anwendungsbereiche von Somatostatin-Analoga

Die vielfältige Präsenz von SST-Rezeptoren in physiologischen und pathologischen humanen Geweben stellt die Voraussetzung der diagnostischen, therapeutischen und radiotherapeutischen Applikation von SST-Analoga dar. Der Nachweis antiproliferativer Wirkungen von Somatostatin ist ebenfalls von elementarer Bedeutung. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse basiert die Überlegung, agonistische SST-Rezeptor-Liganden zu entwickeln, die sich durch vorteilhafte pharmakokinetische und pharmakodynamische Charakteristika auszeichnen und für den klinischen Einsatz eignen. An Radionuklide gekoppelte SSTR-Agonisten, zum Beispiel ¹¹¹In-DTPA-Octreotid, werden in der nuklearmedizinischen Tumordiagnostik und -therapie bereits erfolgreich eingesetzt. Insbesondere von enterochromaffinen Zellen abstammende Tumoren, zum Beispiel Karzinoide, eignen sich zum Einsatz dieser Radiopharmazeutika.

Die SSTR-Expression neuroendokriner Tumoren ist für die Kontrolle der hormonalen Hypersekretion mit Hilfe von Somatostatin-Analoga grundlegend. Im internistisch-onkologischen Bereich kommen die derzeit erhältlichen Somatostatin-Analoga daher zur symptomatischen Therapie exzessiv hormonproduzierender Tumoren zum Einsatz. Die synthetischen Somatostatin-Analoga Octreotide, Lanreotide und Vapreotide sind in den meisten Ländern zur Therapie dieser hormonell bedingten Symptome bei Patienten mit Karzinoiden, neuroendokrinen Pankreastumoren (Insulinome, Gastrinome, VIPome, Glukagonome, Growth-hormone-releasing-factor (GHRF)-produzierende Tumoren, nicht funktionale Inselzelltumoren) und Akromegalie zugelassen. Vor allem in der Behandlung der durch neuroendokrine Pankreastumoren verursachten paraneoplastischen Syndrome werden Octreotide und Lanreotide erfolgreich eingesetzt.

Für die antiproliferative Wirkung dieser Pharmaka spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle [DE HERDER ET AL. 2002]:

1. direkt antimittotische Effekte,
2. Suppression der Produktion und Wirkung von insulin-like growth factor (IGF),
3. Regulation IGF-bindender Proteine und der Wirkung anderer Tumor-Wachstumsfaktoren,
4. Inhibition der Angiogenese und somit der Blutversorgung des Tumors,
5. Modulation immunologischer Reaktionen sowie
6. Induktion von Apoptose.

Für den gezielten diagnostischen und therapeutischen Einsatz von Somatostatin-Analoga ist die Kenntnis der SSTR-Subtyp-Affinität der entsprechenden Substanz maßgeblich. Ebenso entscheidend ist auch die Erforschung der von verschiedenen Tumoren exprimierten Somatostatin-Rezeptor-Subtypen. Die Effektivität der Anwendung wird so durch eine hohe Spezifität und Sensitivität der Rezeptor-Ligand-Bindung gewährleistet. Reubi et al. untersuchten den SST-Rezeptorstatus verschiedener Tumoren. Es zeigte sich eine hohe Dichte an SSTRs sowohl in Primärtumoren als auch in Metastasen. Die Expression der SSTRs blieb auch während einer Langzeit-Octreotid-Therapie kontinuierlich bestehen. Zudem erwies sich eine positive Korrelation zwischen dem Rezeptorstatus und der laborchemisch nachweisbaren Wirkung der Octreotid-Therapie [REUBI ET AL. 1990]. Tumoren und Metastasen, welche die Somatostatin-Rezeptoren SSTR2 und SSTR5 exprimieren, können nach intravenöser Injektion radioaktiv markierter Octreotid-Analoga in vivo szintigraphisch dargestellt werden. Parallel können diese Radionuklid-Peptide zur Radiotherapie SSTR2- und SSTR5-positiver fortgeschrittener oder metastasierter neuroendokriner Tumoren verwendet werden.

Durch verschiedenartige strukturelle Modifikationen des Somatostatin-Moleküls wird versucht, Analoga abzuleiten, die in vitro und in vivo den Eigenschaften von Octreotid überlegen sind. Angestrebt wird neben einer hohen Rezeptor-Spezifität und -Sensitivität unter anderem eine längere Halbwertszeit durch erhöhte Serumstabilität. Eine Steigerung der metabolischen Stabilität der radioaktiv markierten Somatostatin-Analoga führt aufgrund eines verminderten Übertritts von Nukliden auf Serumproteine zu einer erhöhten Selektivität des Peptid-Nuklid-Komplexes. Eine unnötige unspezifische Aktivitätsanreicherung in Organen mit negativem Somatostatin-Rezeptor-Status kann auf diesem Weg deutlich verringert werden. Die Nieren und das

Knochenmark stellen die kritischen und somit dosislimitierenden Organe bei der Anwendung radioaktiv markierter Somatostatin-Analoga dar. Die kleinen Radiopeptide im Blutplasma werden in den Nieren glomerulär filtriert und anschließend von den Zellen des proximalen Tubulus rückresorbiert und gespeichert. Daraus resultiert die Akkumulation von Radioaktivität in den Nieren. Hammond et al. zeigten, dass es durch die Infusion der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin vor, während und nach der Injektion der Radiopharmaka gelingt, den renalen Uptake zu reduzieren [HAMMOND ET AL. 1993].

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass bereits minimale Umgestaltungen des Moleküls zu Abweichungen hinsichtlich der metabolischen Stabilität sowie der Bindungscharakteristika in vitro und in vivo führen. Durch die Integration von D-Aminosäuren oder Pseudo-Peptid-Bindungen in die Aminosäuresequenz konnten partielle Stabilisierungseffekte erzielt werden [BEHR ET AL. 2001A]. Behe et al. zeigten, dass das Einfügen von D-Glutaminsäure eine Verbesserung der Bindung zwischen Peptid und Chelator bei Gastrin zur Folge hat [BEHE ET AL. 2003]. Auch Variationen des Radionuklids (zum Beispiel ¹¹¹Indium, ¹³¹Iod, ¹⁷⁷Lutetium oder ⁹⁰Yttrium) und des Chelators (zum Beispiel diethylen-triamin-pentaacetic acid= DTPA oder tetraazazyklododecane-tetraacetic acid= DOTA) führen zu veränderten Charakteristika eines SST-Analogons [FROIDEVAUX ET AL. 2000]. Dies bezieht sich vorrangig auf Veränderungen des Tumor- und Nierenuptakes.

Hinsichtlich einer spezifischen und sensitiven Bindung an den Rezeptor spielt zudem die Ladung des Peptids und somit die Wasserlöslichkeit eine Rolle [REUBI ET AL. 2000]. Durch den Austausch von Phenylalanin gegen Tyrosin steigt die Wasserlöslichkeit des Moleküls. In der Folge verbessern die hydrophileren Eigenschaften die Rezeptorbindung. Der Austausch von Phenylalanin gegen Tyrosin an Position 3 und von Threoninol gegen Threonin am C-Terminus beeinflusst vor allem die Affinität des Peptids zu den Somatostatin-Rezeptorsubtypen 3 und 5. Der Austausch von Aminosäuren kann durch eine veränderte Ladung des Moleküls neben dem zellulären Uptake die Clearance beeinflussen. Die Internalisierungsrate lässt sich durch Einfügen von Threonin in die Aminosäuresequenz steigern. Durch die Polarität der internalisierten DTPA-konjugierten Radiometaboliten, zum Beispiel ¹¹¹In-DTPA-D-Phe, wird eine Passage durch lysosomale und/oder zelluläre Membranen verhindert [BREEMAN ET AL. 2001]. Des Weiteren zeigte sich ein Einfluss der geometrischen Konfiguration des Peptid-Moleküls auf die Rezeptor-Affinität [REUBI ET AL. 2000].

¹¹¹In-DTPA-Tyr³-octreotate, ein neu synthetisiertes Somatostatin-Analogon, wies gegenüber ¹¹¹In-DTPA-Tyr³-octreotide einen erhöhten Uptake in Tumorzellen bei vergleichbarem Nierenuptake auf. Die als Tracer für Positronen-Emissions-Tomographien (PET) eingesetzten

^{64}Cu -TETA-octreotide und an Octreotide gebundenes ^{68}Ga zeigten verbesserte Tumor-Hintergrund-Verhältnisse. Mit ^{64}Cu -TETA-octreotide konnten bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren mehr Läsionen dargestellt werden als mit ^{111}In -octreotide [HOFLAND & LAMBERTS 2001, ANDERSON ET AL. 2001].

Das zur Darstellung SSTR-positiver Tumoren verwendete Radiopharmazeutikum $^{111}\text{Indium}$ -DTPA-Octreotid bindet in erster Linie an die Somatostatin-Rezeptor-Subtypen 2 und 5. Somit ist es nicht möglich, SSTR-positive Tumoren in jedem Fall darzustellen, denn einige Tumoren sind durch die Dominanz anderer Rezeptor-Subtypen gekennzeichnet. Die Mehrheit SSTR-tragender Tumoren exprimiert vornehmlich einen bestimmten Rezeptor-Subtyp. Zum Teil lassen sich auf der Oberfläche von Tumorzellen auch verschiedene SSTR-Subtypen zugleich nachweisen [REUBI ET AL. 2001]. Das gleichzeitige Vorhandensein verschiedener SSTR-Subtypen erklärt die variablen Ansprechraten auf die vorrangig SSTR2-affinen SST-Analoga. Auch die Unterschiede in der Darstellbarkeit solcher Tumoren mittels SSTR-Szintigraphie sind dadurch erklärbar. Metastasen SSTR-positiver Tumoren exprimieren initial den gleichen SSTR-Subtyp wie der Primarius und sind somit gleichzeitig darstellbar. Kommt es jedoch zunehmend zu einer Entdifferenzierung des Tumors, gehen diese Rezeptoren verloren [SLOOTER ET AL. 2001].

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von vier Substanzen (U1-4), die sich von der Ausgangssubstanz Somatostatin-14 ableiten, sich jedoch bezüglich der Aminosäuresequenz unterscheiden. Geprüft werden diese Substanzen im Hinblick auf die Möglichkeit der Kopplung eines Radionuklids an das Molekül, die Stabilität in humanem Serum, die Internalisierung des Peptid-Nuklid-Komplexes in AR42J-Zellen und die Biodistribution in vivo anhand des Mausmodells. In folgenden Merkmalen unterscheiden sich die Substanzen vom Ursprungspeptid Somatostatin-14:

- U1: Die basische Aminosäure Lysin an den Positionen 4 und 9 ist jeweils mit einer Schutzgruppe (BOC) versehen.
- U2: Die basische Aminosäure Lysin an den Positionen 4 und 9 ist jeweils mit einer Schutzgruppe (BOC) versehen. Zusätzlich wurde an Position 8 das natürliche Enantiomer der heterozyklischen Aminosäure Tryptophan, welches die L-Konfiguration besitzt, durch das D-Enantiomer ersetzt.

- U3: Die neutrale Aminosäure Alanin an Position 1 wurde entfernt. An Position 2 wurde Glycin durch das D-Enantiomer der sauren Aminosäure Glutaminsäure ersetzt. Die basische Aminosäure Lysin an den Positionen 4 und 9 ist jeweils mit einer Schutzgruppe (BOC) versehen. Zusätzlich wurde an Position 8 L-Tryptophan durch D-Tryptophan ersetzt.
- U4: Die basischen Aminosäuren Lysin an Position 4 und Serin an Position 13 wurden entfernt. An Position 8 wurde L-Tryptophan durch D-Tryptophan ersetzt. Die Aminosäure Lysin an Position 9 wurde mit einer Schutzgruppe versehen.

4.2 Neuroendokrine Tumoren des Verdauungstraktes

Neuroendokrine Tumoren stellen mit einem Anteil von ca. 2% nur einen geringen Teil der gastrointestinalen Tumoren dar. Im Pankreas lokalisierte neuroendokrine Tumoren des Verdauungstraktes kommen bei weniger als 1% der Bevölkerung vor. Die häufigsten gastrointestinalen endokrinen Pankreastumoren sind Karzinoide, Gastrinome, VIPome, Insulinome und Glukagonome. Sie sind in Abhängigkeit von der Hormonproduktion mit vielfältigen klinischen Symptomkomplexen assoziiert. Innerhalb dieser Gruppe besitzen die Karzinoide mit 55% den größten Anteil. Im Folgenden werden neben der Epidemiologie und dem Krankheitsbild die Diagnostik und Therapie des Karzinoids erläutert.

4.2.1 Karzinoide

Die Inzidenz von Karzinoiden beträgt weniger als 1/100000 Einwohner/Jahr. Die Prävalenz liegt zwischen 2-20/100000 Einwohner [DEGEN ET BEGLINGER 1999]. Das Karzinoid stellt einen langsam wachsenden epithelialen Tumor dar, der von den enterochromaffinen Zellen des gesamten Gastrointestinaltraktes oder auch den endokrin aktiven Zellen des Bronchialsystems,

Thymus, Pankreas und Ovars ausgeht. Dieser Tumor zeichnet sich hauptsächlich durch die Produktion und Sekretion von Serotonin, seltener auch von Tachykininen, Corticotropin (ACTH), Histamin, Dopamin, Substanz P, Kallikrein oder Prostaglandinen aus. Zu unterscheiden sind metastasierende Karzinoidtumoren von solitären Karzinoiden der Appendix. Der metastasierende Typus ist bevorzugt im Bereich des Ileums, vereinzelt auch in anderen Darmabschnitten, dem Bronchialsystem oder dem Pankreas lokalisiert. Das solitäre Karzinoid der Appendix zeigt in über 99% der Fälle einen gutartigen Verlauf ohne Anzeichen invasiven oder stenosierenden Wachstums. Auch im Kolon oder Rektum lokalisierte Karzinoide weisen ein eher benignes Verhalten auf. Hingegen metastasieren vor allem die im Bereich des Ileums lokalisierten Formen frühzeitig. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist es vielfach bereits zu einer Lymphknoten- oder Leberfilialisierung gekommen. Das paraneoplastische so genannte Karzinoid-Syndrom (Steiner-Voerner-Syndrom, Hyperserotonismus), das durch anfallsartiges Auftreten von Flush, Tachykardien, starkem Schwitzen, Pellagra-artigen Hautveränderungen, asthmaähnlicher Atemnot durch Bronchospasmen sowie kolikartigen Bauchschmerzen mit Diarrhoe gekennzeichnet ist, tritt erst bei in die Leber metastasierten Karzinoiden in Erscheinung. Im Verlauf kann als Komplikation eine Endokardfibrose auftreten. Vor einer Leber-Metastasierung wird das durch den Tumor übermäßig sezernierte Serotonin in der Leber effektiv metabolisiert. Das Karzinoid-Syndrom tritt in etwa bei jedem Zehnten Karzinoid-Patienten in Erscheinung. Gutartige Verlaufsformen des Karzinoids bleiben in der Regel asymptomatisch und stellen einen häufigen Zufallsbefund nach Appendektomie dar. Die Anzahl der im Rahmen von Autopsien diagnostizierten Karzinoide übersteigt die Inzidenz dieser Erkrankung von $<1/100000$ Einwohner/Jahr weitaus. Maligne, metastatische Krankheitsverläufe manifestieren sich erst in fortgeschrittenen Stadien, in denen der oben beschriebene Symptomenkomplex des Karzinoid-Syndroms beobachtet werden kann. Die Metastasierung in die Leber verschlechtert die Prognose des Patienten drastisch, die 5-Jahres-Überlebensrate sinkt auf unter 50%. Lebensbedrohlich ist eine so genannte Karzinoid-Krise, die mit ausgedehnten Störungen des zentralen Nervensystems bis zum Koma und des kardiovaskulären Systems mit schweren kardialen Arrhythmien und Hypotonie einhergehen kann. Vielfach ist ein Auslösen dieser Symptomatik durch Alkoholgenuss, körperliche Anstrengung, Palpation der Leber sowie durch die Aufnahme tyraminhaltiger Speisen (Schokolade, Walnüsse, Bananen) beschrieben worden [KALTSAS ET AL. 2004].

4.2.2 Diagnostik von Karzinoiden

Zur Verdachtsdiagnose eines Karzinoids führt neben der evtl. typischen klinischen Symptomatik zunächst der laborchemische Nachweis erhöhter Serotonin-Spiegel im Serum sowie die gesteigerte Konzentration des Serotonin-Metaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) im Urin. Im Anschluss daran wird anhand radiologischer und endoskopischer Untersuchungen die Lokalisation des Primärtumors ermittelt. Tumoren und Metastasen mit positivem Somatostatin-Rezeptorstatus (SSTR-Subtypen 2 und 5) können szintigraphisch dargestellt werden. Zur Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie wird dem Patient [¹¹¹In-DTPA-D-Phe]octreotide, ¹¹¹In-pentetreotide (Octreoscan[®]) oder ¹¹¹In-DOTA-lanreotide (¹¹¹In-MAURITIUS[®]) intravenös injiziert. Ein positives Szintigramm bei einem Patient mit neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumor weist gleichzeitig auf die therapeutische Wirksamkeit von Octreotid-Analoga bezüglich der hormonalen Hypersekretion durch den Tumor hin. Bei zu geringer Dichte der entsprechenden SST-Rezeptoren, nicht rezeptortragenden Tumoren oder sehr hoher endogener Somatostatin-Produktion der Tumoren resultieren falsch negative Szintigramme. Falsch positive Ergebnisse ergeben sich zum Beispiel durch Anreicherung des Radionuklid-Peptids in nicht neoplastischen SSTR2- und SSTR5-exprimierenden Geweben. Falsch positive Untersuchungsergebnisse kommen gehäuft bei Patienten mit granulomatösen und autoimmun bedingten Erkrankungen vor. Bei den bislang in der Literatur beschriebenen falsch positiven Ergebnissen könnte es sich jedoch vielfach um Mikrometastasen gehandelt haben [KALTSAS ET AL. 2004]. Die SST-Rezeptor-Szintigraphie eignet sich auch nach erfolgter Operation zum Nachweis oder Ausschluss eines erneuten Tumorwachstums oder einer Metastasierung. Insgesamt stellt diese Untersuchung eine sehr sensitive und spezifische Methode dar. Radioaktiv markierte SST-Analoga können auch in Kombination mit einem chirurgischen Eingriff zum Einsatz kommen. Der Operateur kann intraoperativ mit Hilfe einer Radioaktivitätssonde Tumorgewebe identifizieren und komplett reseziieren.

4.2.3 Therapie von Karzinoiden

Bedeutend ist die Erkenntnis, dass Patienten mit fortschreitendem Karzinoid nicht aufgrund der Tumorprogression versterben. Vielmehr ist hierfür die Symptomatik verantwortlich, die durch die hormonale Hypersekretion verursacht wird. Jegliche Behandlungsstrategie der Karzinoide schließt die chirurgische Intervention ein. Sie stellt die Therapie der Wahl lokaler Tumoren oder lokaler und regionaler Metastasen dar. Zielstellung einer Operation ist das exakte Staging und die genaue Lokalisation aller Tumorteile. Somit soll die chirurgische Resektion des Tumors in toto ermöglicht werden. Dies ist die einzige Methode, die zur Heilung des Patienten führen kann. Durch die meist geringe Größe und das gelegentlich multifokale Wachstum des Tumors gestaltet sich die Operation jedoch problematisch. Ist eine radikale Operation in kurativer Absicht nicht mehr möglich, wird mit dem Ziel der Tumormassenreduktion (Debulking) palliativ operiert. In weiter fortgeschrittenen Krankheitsstadien und auch bei wenig differenzierten Tumoren mit raschem Progress wird eine aggressive antiproliferative Chemotherapie durchgeführt. Die Therapie von Lebermetastasen umfasst chirurgische Maßnahmen (unter anderem selektive segmentale Leberresektion) und Verfahren, die zur Ischämie des Tumorgewebes führen (Ligation oder selektive Embolisation bzw. Chemoembolisation der Arteria hepatica u.ä.). Ziel ist die Reduktion der Tumormasse. Die Ergebnisse konventioneller Chemotherapie-Regime sind jedoch unzureichend, zumal schwere kardio- und nephrotoxische Nebenwirkungen sowie Knochenmarksuppression den Patienten belasteten. Die Einführung von Somatostatin-Analoga zur symptomatischen Therapie des Karzinoidsyndroms lebermetastasierter Tumoren bedeutete einen enormen Fortschritt für die Karzinoid-Therapie. Die palliativen Therapieansätze zielen auf eine Milderung der paraneoplastischen Symptomatik, die Reduktion des Tumorwachstums und insbesondere auf die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Diese definiert sich in erster Linie über die Möglichkeit, das tägliche Leben selbständig bewältigen zu können [DEGEN ET BEGLINGER 1999].

Hauptziele der Octreotid- Therapie

1. Milderung der Symptomatik (Suppression der Hormonproduktion)
 2. Inhibition des Tumorwachstums
 3. Verbesserung der Lebensqualität des Patienten
-

Tab.4.1 Hauptziele der Octreotid- Therapie

Eine Octreotide-Therapie (subkutane Applikation) bei Patienten mit metastasiertem Karzinoid führte bei über 90% der Behandelten zur Besserung der durch den Hyperserotonismus verursachten Beschwerdesymptomatik. Laborchemisch ließ sich in 60-70% der Fälle eine Wirkung nachweisen, die sich in Form eines rückläufigen Serum-Hormonspiegels ausdrückt. Eine Regression des Tumors zeigte sich bei 10%, eine temporäre Stabilisierung des Tumorwachstums konnte bei mehr als 80% der Patienten dokumentiert werden. Insgesamt verbesserte sich die Lebensqualität der Patienten dadurch erheblich. Vergleichbare Ergebnisse werden mit subkutan injiziertem Lanreotide erzielt. Von großem Vorteil für den Patienten sind die Depot-Präparationen von Octreotide (Sandostatin LAR®) bzw. Lanreotide (Lanreotide-PR®). Bedingt durch die langsame Abgabe des Wirkstoffs aus einem intramuskulären Depot ist die Applikation des Medikaments nur in zwei- bzw. vierwöchigen Intervallen notwendig [DE HERDER ET AL. 2002]. Die tägliche subkutane Injektion konnte somit ersetzt werden. Dieser Aspekt wirkt sich positiv auf die Compliance des Patienten aus, da dieser von dem verbesserten Patienten-Komfort profitiert.

In Abb.4.1 wird dargestellt, wie sich die klinische Symptomatik bei Patienten mit metastasiertem Karzinoid und Karzinoid-Syndrom durch Octreotid-Therapie verbessert.

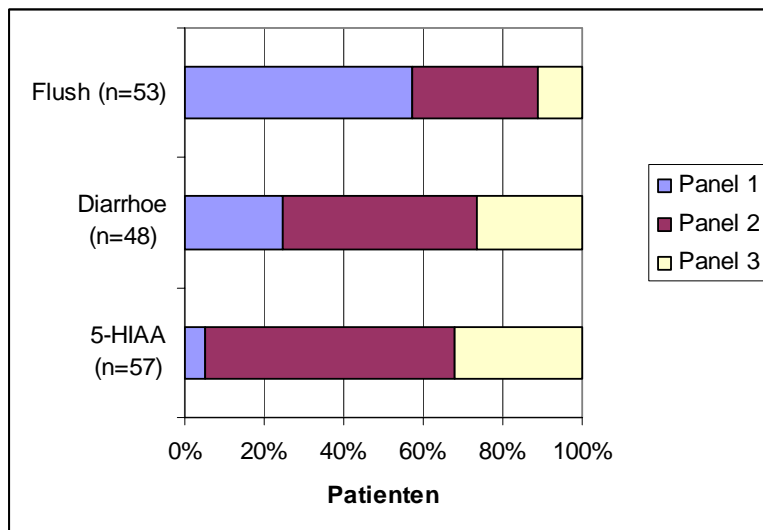


Abb.4.1 Verbesserung der Flush-Symptomatik, der Diarrhoe und Verminderung der 5-HIAA- Exkretion nach Octreotid-Therapie; Panel 1: vollständige Verbesserung, Panel 2: >50% Verbesserung [aus DE HERDER ET AL. 2002]

Durch die Vielfalt diagnostischer und therapeutischer Optionen bei neuroendokrinen Tumoren ist ein multidisziplinäres Behandlungskonzept erforderlich, an dem Gastroenterologen, Endokrinologen, Onkologen, Chirurgen, Nuklearmediziner und Pathologen beteiligt sind. Aufgrund der relativ geringen Inzidenz neuroendokriner Tumoren sollte deren Therapie spezialisierten, erfahrenen Zentren vorbehalten bleiben.

4.2.4 Nebenwirkungen der Therapie mit Somatostatin-Analoga

Somatostatin-Analoga werden in der Regel sehr gut toleriert, sie besitzen ein günstiges Nebenwirkungsprofil. Nebenwirkungen treten selten auf und beschränken sich auf einen geringen Umfang. Folgende unerwünschte Nebenwirkungen werden beschrieben: lokale Irritationen an der Injektionsstelle (Schmerzen, Schwellung, Erythem), Übelkeit, abdominale Symptome (krampfartige oder kolikartige Schmerzen), Verdauungsbeschwerden, Meteorismus, Diarrhoe, Steatorrhoe sowie Hautausschläge und Alopezie. Gelegentlich kommt es zu leichten Schwankungen des Blutzuckerspiegels. Bei 20-50% der Patienten bilden sich klinisch asymptomatische biliäre Steine und Sludge in der Gallenblase. Das Risiko für die Entwicklung symptomatischer Gallensteine durch Octreotid- Therapie liegt unter einem Prozent.

4.3 Radiopharmakologische Therapie neuroendokriner Tumoren

Die radikale Tumor-Chirurgie stellt die bislang einzige Methode mit Aussicht auf Heilung dar. Ist jedoch eine chirurgische Intervention nicht möglich, sollte sich das Behandlungskonzept an aktuell etablierten Klassifikationssystemen und prognostischen Faktoren orientieren. Die Anwendung von Radiopharmazeutika kommt zum frühen Zeitpunkt unter adjuvanten Gesichtspunkten, postoperativ zur Eradikation okkulten Tumorresiduen oder später zur Therapie disseminierter Tumoren in Betracht. Radioaktiv markierte Somatostatin-Analoga, zum Beispiel ^{111}In -octreotide, kommen für Patienten infrage, deren Tumor im Rahmen der szintigraphischen Diagnostik das Radionuklid-Peptid anreicherte. Das Radiopharmazeutikum wird als Rezeptor-Ligand-Komplex in die SSTR-positiven Tumorzellen internalisiert und gelangt somit in unmittelbare Nähe des Nukleus. In malignen Tumoren wirkt ^{111}In antiproliferativ, wenn es sich in Reichweite seines Hauptzieles, der zellulären DNA, befindet. Das Radionuklid ^{111}In emittiert hauptsächlich γ -Strahlen, die für die szintigraphische Darstellung des Tumors von Bedeutung sind, sowie Auger-Elektronen und Konversions-Elektronen. Auger-Elektronen besitzen eine Gewebe-Eindringtiefe von 20nm bis 15 μm . Befindet sich die zelluläre DNA in diesem Radius, so ist die Radiotoxizität von Auger-Elektronen besonders hoch. Der hohe Uptake an Radioaktivität

in maligne Zellen ist von großer Bedeutung, denn nicht neoplastische SSTR-positive Gewebe sollen den toxischen Wirkungen des Radioliganden möglichst minimal exponiert sein [BREEMAN ET AL. 2001].

Krenning et al. überprüften die Wirksamkeit der endogenen Radiotherapie durch ^{111}In -octreotide bei 21 Patienten mit fortschreitenden gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren. Die Patienten, die sich in einem Spätstadium der Erkrankung befanden, erhielten Kumulativ-Dosen von 20GBq. Bei 6 dieser Patienten zeigte sich der antiproliferative Effekt von ^{111}In durch eine Abnahme des Tumolvolumens, bei weiteren 8 Patienten konnte der Tumorprogress aufgehalten werden. Es erwies sich, dass die Therapie umso erfolgreicher war, je höher der ^{111}In -Uptake des Tumorgewebes war [KRENNING ET AL. 1999]. Anthony et al. zeigten bei weiteren 27 Patienten, die mit zwei Dosen ^{111}In -pentetreotide behandelt wurden, ein partielles Ansprechen bei 2 Patienten (8%). Bei 7 Patienten (27%) wurde eine signifikante Nekrose des Tumors beobachtet, ohne dass Nebenwirkungen auftraten. Im Mittel überlebten die Patienten bei erwarteten 6 Monaten noch 18 Monate [ANTHONY ET AL. 2002].

Thema dieser Arbeit ist die Überprüfung der vier bereits beschriebenen neu synthetisierten Somatostatin-Analoga im Hinblick auf die Möglichkeit der Kopplung eines Radionuklids an das Molekül, die metabolische Stabilität in humanem Serum, die Internalisierung des Peptid-Nuklid-Komplexes in AR42J-Zellen und die Biodistribution in vivo anhand des Mausmodells. Nachfolgend werden die Resultate der verschiedenen Versuchsabschnitte erörtert.

4.4 Kopplung von Indium-111 an das DTPA-Peptid

Eine Voraussetzung für die therapeutische Anwendbarkeit der untersuchten Substanzen ist die erfolgreiche Kopplung von ^{111}In an die Peptide. Der Radiometall-Chelator DTPA ist für die Bindung des Nuklids an die Peptide grundlegend. Vor jedem weiteren Versuchsschritt wird der Erfolg der Markierung überprüft. Die Resultate der Qualitätskontrollen sollten für klinische Zwecke Markierungsanteile von über 90% zeigen. Als Vergleichswert dienen Ergebnisse des handelsüblichen Markierungs-Kits für Octreoscan[®] der Firma Mallinckrodt. Bei korrekter Anwendung sind hiermit Ergebnisse von deutlich über 90% Markierungsanteil gesichert.

Alle vier untersuchten Peptide erreichten das geforderte Ergebnis und ließen sich gut mit ^{111}In markieren. Die Somatostatin-Analoga U1 und U2 lagen mit jeweils durchschnittlich 95,5% Markierungsanteil deutlich über den geforderten 90%. Die geringen Standardabweichungen von $\pm 5,2\%$ bei U1 und $\pm 4,7\%$ bei U2 weisen auf die Zuverlässigkeit der Markierung hin. Das Peptid U4 zeigte mit 93,3% im Durchschnitt geringfügig niedrigere Markierungsanteile. Die größere Standardabweichung von $\pm 7,2\%$ kommt durch zwei Messwerte zustande, die mit 73,5% bzw. 80,9% deutlich unterhalb der restlichen Resultate liegen. Als Ursache für diese abweichenden Werte kommen Mess- oder Markierungsfehler infrage. Ungenaue pH-Wert-Einstellungen von Pufferlösungen und Verunreinigungen verwendeter Substanzen oder Materialien kommen als Ursache hierfür in Betracht. Die im Vergleich geringsten Markierungsanteile zeigte das Peptid U3 mit 91,6%. Zugleich ergab sich die größte Streubreite an Messwerten, die Standardabweichung beträgt $\pm 8,9\%$. Grund dafür sind einzelne Messwerte von 71,6% und 75,4% Markierungsanteil, die wahrscheinlich als Folge von abweichenden Bedingungen in der Versuchsdurchführung zu werten sind. Die Zuverlässigkeit und Stabilität der Markierungsergebnisse lässt sich durch Optimierung der Versuchsbedingungen möglicherweise noch verbessern. Unter Umständen spielen neben dem pH- Wert während des Versuchsablaufs auch Bedingungen wie die Temperatur oder im Laufe der Reaktion anfallende Nebenprodukte eine Rolle.

Die Verwendung eines anderen Radiometall-Chelators kann zu veränderten Markierungsergebnissen führen, da der Chelator für die Bindung zwischen Peptid und Nuklid entscheidend ist.

4.5 Komplexstabilität in humanem Serum

Mit Hilfe von PD10-Säulen wurde die Stabilität der Peptid-Nuklid-Komplexe in humanem Serum gesunder Spender untersucht. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über vierundzwanzig Stunden, Messungen wurden nach fünf Minuten, dreißig Minuten, einer Stunde, zwei Stunden sowie vierundzwanzig Stunden vorgenommen. Im Zeitverlauf wird ein Teil der Radionuklide auf Serumproteine transferiert. Die Serumstabilitätsprüfungen zeigen, dass der Umfang dieser Nuklidübertragung auf Serumproteine zwischen den Testsubstanzen differiert. Insgesamt stellte sich heraus, dass bei allen vier untersuchten Substanzen im Versuchszeitraum weniger als 25%

der Nuklide auf Serumproteine übertragen wurden. Für das im nuklearmedizinischen Bereich vielfach angewandte Octreoscan[®] ist eine Serumstabilität von über 90% gesichert. Als stabilstes unter den getesteten Substanzen erwies sich ¹¹¹In-DTPA-U3 mit einem Anteil von ca. 93% stabil an das Peptid gebundener Aktivität nach vierundzwanzig Stunden. Einen Hinweis auf die gute Stabilität dieser Substanz gibt auch die Beobachtung, dass sie während des gesamten Versuchszeitraums konstant zu über 85% stabil war. Hinsichtlich der Serumstabilität ist ¹¹¹In-DTPA-U3 mit Octreoscan[®] vergleichbar, so dass unter diesem Gesichtspunkt Einschränkungen der klinischen Anwendbarkeit nicht zu erwarten sind.

Beeinflussungen der Messwerte durch verunreinigte Reagenzien oder Unregelmäßigkeiten im Versuchsablauf sind jedoch nicht außer Acht zu lassen. Die Beobachtung, dass im Versuchsablauf der Anteil an stabilen Peptid-Nuklid-Komplexen zunächst leicht abfällt und anschließend wieder ansteigt ist höchstwahrscheinlich auf Messfehler infolge dieser Fehlerquellen zurückzuführen.

Bei ¹¹¹In-DTPA-U1 und ¹¹¹In-DTPA-U2 zeigte sich nach vierundzwanzig Stunden eine Stabilität der Peptid-Nuklid-Komplexe von ca. 88% bzw. 83%. Durch die Ausschaltung entsprechender Fehlerquellen und Optimierung der Versuchsbedingungen muss auch hier nicht von einer eingeschränkten klinischen Anwendbarkeit durch unzureichende Serumstabilität ausgegangen werden. Hingegen konnte bei ¹¹¹In-DTPA-U4 eine deutlich vermehrte Transferierung von ¹¹¹In auf Serumproteine beobachtet werden. Nach Ablauf der Versuchszeit ließen sich noch ca. 75% der zugegebenen Testsubstanz im Probandenserum nachweisen.

Neben der Übertragung von Radionukliden auf Serumproteine werden die Peptide U1-4 von Serum- Peptidasen enzymatisch gespalten. Es ist denkbar, dass sich die entstandenen Spaltprodukte hinsichtlich der Bindung an den Rezeptor und der Internalisierung in die Zielzellen von der Ausgangssubstanz unterscheiden. Die durch enzymatische Degradierung entstandenen Metaboliten führen möglicherweise zu unerwünschten unselektiven Aktivitätsanreicherungen in Organen und Geweben mit negativem SST-Rezeptorstatus. Abbau- und Ausscheidungswege der untersuchten Somatostatin-Analoga lassen sich am besten im Rahmen von Biodistributionsstudien verfolgen.

4.6 In vitro-Bindungs- und Internalisierungsstudien

Die vier verschiedenen Somatostatin-Analoga wurden im Hinblick auf ihre Bindungs- und Internalisierungscharakteristika an AR42J-Zellen überprüft. AR42J ist eine chemisch induzierte, exokrine Pankreastumorzelllinie der Ratte, die durch eine hohe Dichte an Somatostatin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche gekennzeichnet ist [HOFSLI ET AL. 2002]. Die unkomplizierte Kultivierung, Subkultivierung und Versorgung dieser Zellen war für die Versuchsplanung und -durchführung von großem Vorteil.

Die Versuche zeigen, ob die Testsubstanzen spezifisch an die Somatostatin-Rezeptoren auf der Oberfläche der AR42J-Zellen binden und in welchem Umfang anschließend eine Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe in einem Zeitraum von 20 Minuten erfolgt.

Das Somatostatin-Derivat U2 zeigt mit durchschnittlich 45% die höchste Internalisierungsrate der untersuchten Substanzen. Die große Streubreite der Messwerte führt jedoch zu einer erheblichen Standardabweichung von $\pm 29,6\%$. Bei U3 ließ sich nach 20 Minuten ein Anteil von 37% der Peptid-Nuklid-Komplexe im Zellinneren nachweisen. Auch hier war die Standardabweichung mit $\pm 14,8\%$ nicht gering.

Die zum Teil erhebliche Heterogenität der Messdaten weist darauf hin, dass bereits kleine Abweichungen der Versuchsbedingungen oder im Versuchsablauf erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse haben können. Eine denkbare Einflussgröße ist zum Beispiel die Anzahl der Zellen pro Well, die zwischen einzelnen Versuchen leicht schwanken kann. Ebenfalls kommen Verunreinigungen von Pufferlösungen und verwendeten Materialien als Fehlerquellen in Betracht. Von Relevanz ist auch das Einhalten der im Standardprotokoll vorgegebenen Temperaturen, da eine Temperaturabhängigkeit der Internalisierung bereits unter anderem von de Jong et al. beschrieben wurde [DE JONG ET AL. 1998]. Großer Wert muss auch auf exaktes Pipettieren der radioaktiv markierten Peptide und der Blocksubstanz gelegt werden. Zudem ist nicht außer Acht zu lassen, dass die Kultivierung von Zellen im Laufe der Zeit durch häufige Passage und Subkultivierung zu möglichen Abwandlungen der Zellen führt. So kann eine Entdifferenzierung der Zellen den Verlust von Rezeptoren auf der Zelloberfläche nach sich ziehen.

Das Peptid U1 erreichte mit durchschnittlich 26% die geringsten Internalisierungsraten bei einer Standardabweichung von $\pm 0,4\%$. Bei U4 zeigte sich eine Internalisierung von $29 \pm 9,7\%$.

Demnach ließ sich bei allen untersuchten Somatostatin- Analoga *in vitro* eine Anreicherung im Zellinneren belegen, wobei sich teilweise deutliche Divergenzen zwischen den einzelnen Testsubstanzen zeigen. Die Unterschiede bezüglich der durchschnittlichen Internalisierungsraten verdeutlichen den Einfluss der veränderten Aminosäuresequenzen auf die spezifische Bindung und die Internalisierung der rezeptorgebundenen Aktivität.

Das zum Vergleich getestete Octreoscan[®] wurde zu 83,6% internalisiert und ist somit allen vier neu synthetisierten Somatostatin-Analoga unter *in vitro*-Bedingungen weitaus überlegen. Dieses Resultat ist als Hinweis darauf zu werten, dass die hier getesteten potentiellen Radiopharmaka aufgrund ihres Bindungs- und Internalisierungsverhaltens für klinische Zwecke nicht infrage kommen. Aufschluss hierüber gibt letztendlich die Untersuchung der Biodistribution der Somatostatin-Derivate im Tiermodell.

4.7 Biodistribution im Mausmodell

Die Versuche zur Überprüfung der Bioverteilung wurden an athymischen, immunsupprimierten Nacktmäusen durchgeführt, die über keine zelluläre Immunantwort verfügen. An der Hinterflanke der Versuchstiere ließ sich ein Tumor abgrenzen, dessen Wachstum durch die subkutane Injektion von AR42J-Zellen induziert wurde. Der positive Somatostatin-Rezeptor-Status der Tumorzellen ist dadurch gewährleistet. Aufgrund dessen eignen sich die Versuchstiere zur Untersuchung der Biodistribution der markierbaren Somatostatin-Analoga. Weitere Arbeitsgruppen, unter anderem Froidevaux et al., konnten dies bereits bestätigen [FROIDEVAUX ET AL. 2000].

Zunächst wurde die Bioverteilung der Somatostatin-Derivate U1, U2 und U3 vier Stunden nach Injektion in die Schwanzvene des Versuchstieres untersucht. Die Biodistribution der Substanz U4 wurde aufgrund der unzureichenden Resultate der Serumstabilitätsversuche und der Ergebnisheterogenität der Internalisierungsstudien bei AR42J-Zellen nicht untersucht. Da sich

für das Peptid U1 nach vier Stunden im Vergleich die günstigste Bioverteilung mit dem geringsten Nierenuptake und dem höchsten Tumoruptione herausstellte, schlossen sich für diese Substanz Messungen der Biodistribution nach einer sowie vierundzwanzig Stunden an. Die Resultate ergeben sich aus dem Mittelwert der Messdaten von drei Versuchsmäusen pro Substanz und Messzeitpunkt, sie werden in der Einheit Prozent injizierte Dosis pro Gramm Organgewicht angegeben. Die Organe Herz, Lunge, Milz, Pankreas, Magen, Leber, Nieren, Nebennieren, Darm, Muskel, Knochen wurden neben einer Blutprobe aus der Aorta und dem gesamten Tumor entnommen und bezüglich der angereicherten Aktivität untersucht.

In allen Versuchsreihen zeigte sich die weitaus größte Aktivitätsanreicherung in den Nieren. Demzufolge sind die Nieren das Hauptausscheidungsorgan der intravenös injizierten Radionuklid- Peptide. Die Leber als Hauptmetabolisierungsorgan spielt bezüglich der Elimination der Peptid-Nuklid-Komplexe aus dem Körper eine sehr geringe Rolle. Dies wird durch die niedrigen Aktivitätsanreicherungen in der Leber zu jedem Zeitpunkt der Messung bei allen untersuchten Substanzen belegt. Die überwiegend renale Eliminierung weist darauf hin, dass die Nieren das Dosis-limitierende Organ darstellen. Die maximal tolerierbare Nierendosis von 27Gy ist das einschränkende Kriterium der klinischen Nutzbarkeit der Radiopharmazeutika.

Im Tumorgewebe ließ sich eine erhöhte Aktivitätsanreicherung nur nach Injektion des markierten Peptids U1 nachweisen. Vier Stunden nach Injektion war eine Aktivität von ca. 1,1% der injizierten Dosis pro Gramm Tumorgewebe messbar. Bezogen auf die Aktivitätsanreicherung im Tumorgewebe besitzt U1 damit die günstigsten Eigenschaften. Gleichzeitig konnte bei U1 im Vergleich zu U2 und U3 mit etwa 14% der injizierten Dosis pro Gramm Organgewicht der geringste Nierenuptake verzeichnet werden.

Die anderen entnommenen und untersuchten Organe und Gewebe zeigten im Durchschnitt zu keinem Messzeitpunkt vermehrte Anreicherungen an Aktivität. Für den Magen und das Pankreas ließen sich keine signifikant erhöhten Uptake-Werte im Vergleich zu den umgebenden Organen dokumentieren. Der zum Teil leicht erhöhte Magen- und Pankreasuptake bei einigen Versuchsmäusen lässt sich durch das Vorhandensein von zahlreichen Somatostatin-Rezeptoren in diesen Organen erklären.

Im Rahmen der Zellversuche zeigten die untersuchten Radiopeptide im Vergleich zu Octreoscan® eine deutlich verminderte Internalisierungsquote. Im anschließenden in vivo-Versuch bestätigte sich dies durch einen ebenfalls geringen Tumoruptione. Froidevaux et al. konnten bei Untersuchungen der in vivo-Biodistribution von Octreoscan® einen deutlich

höheren Tumoruptionen verglichen mit den hier erzielten Resultaten mit U1, U2 und U3 zeigen [FROIDEVAUX ET AL. 2000].

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Werte, dass sich keine der untersuchten Substanzen in ausreichendem Umfang im Tumorgewebe anreichert und sich somit als klinisch einsetzbares Radiopharmazeutikum eignen würde. Sowohl die *in vitro*- als auch die *in vivo*-Resultate unterstreichen die Überlegenheit von Octreotid gegenüber den getesteten neu synthetisierten Somatostatin-Analoga.

Basierend auf diesen Erkenntnissen ist es vorstellbar, das markierbare Peptid U1 bezüglich der Bindungs-Charakteristika und Rezeptorsubtyp-Spezifität genauer zu untersuchen und gegebenenfalls für eine potentielle pharmakologisch-nuklearmedizinische Anwendung weiterzuentwickeln.

4.8 Zukunftsperspektiven

Es ist zu erwarten, dass sich das Prinzip der Endoradiotherapie zur Behandlung neuroendokriner Tumoren in den nächsten Jahren bedeutend weiterentwickeln wird. Die Applikation von markierten Somatostatin-Analoga kann zur Therapie eines weiten Spektrums neuroendokriner Tumoren eingesetzt werden. Nach dem bisherigen Wissensstand ist bei regelmäßiger Wiederholung der Therapie eine Stabilisierung der Erkrankung für einen Zeitraum von einigen Jahren wahrscheinlich. Derzeit werden neue, mit verschiedenen Radioliganden kombinierte Somatostatin-Analoga entwickelt, die sich durch überlegene Eigenschaften im Hinblick auf einen potentiellen diagnostischen und therapeutischen Einsatz auszeichnen. Abhängig vom SSTR-Verteilungsmuster und der Tumorgroße werden sich β -emittierende Radioliganden, wie [^{90}Y -DOTA⁰,Tyr³]-octreotide (OctreoTher), [^{177}Lu -DOTA⁰,Tyr³]-octreotate und ^{90}Y -lanreotide, in naher Zukunft eventuell als effektiver für die SSTR-gezielte Radiotherapie erweisen. Froidevaux et al. konnten bereits im Tierversuch für an ^{111}In und ^{90}Y gebundenes DOTATOC (DOTA⁰-(D)Phe¹-Tyr³-octreotide) einen Tumoruptionen nachweisen, der den Nierenuptionen übertraf. Die starke Akkumulation der Substanz im Tumorgewebe und die rasche Clearance aus den umgebenden Organen führten zu hervorragenden Tumor-Hintergrund-Verhältnissen. Auch die renale Retention von Radioaktivität war deutlich reduziert. Der *in vivo*-Tumoruptionen von

DOTATOC korrelierte mit der *in vitro* untersuchten Bindungsaffinität zu SST-Rezeptoren an der Tumorzelloberfläche. Zusammenfassend zeigten die Versuche dieser Arbeitsgruppe die überlegenen Eigenschaften von DOTATOC gegenüber den anderen untersuchten DOTA-gekoppelten Somatostatin-Analoga. DOTATOC zeichnet sich durch eine rasche Clearance aus SSTR-negativen Geweben mit Ausnahme der Nieren, einen spezifischen Uptake in SSTR-positiven Geweben, vor allem des Tumors, eine sehr gute Tumorpenetration und somit ein ausgezeichnetes Biodistributionsprofil aus. DOTATOC stellt daher eine vielversprechende Substanz für den künftigen Einsatz auf dem Gebiet der nuklearmedizinischen Diagnostik und Therapie dar [FROIDEVAUX ET AL. 2000].

Des Weiteren bildet die Verbesserung der Effizienz der endogenen Radiotherapie durch die Kombination mit Chemotherapeutika einen weiteren Ansatzpunkt. Octreotid-Analoga werden bereits mit verschiedenen zytotoxischen Verbindungen zusammengefügt. Durch diese Verknüpfung wird versucht, das Zielgewebe für Strahlung zu sensibilisieren, so dass folglich synergistische Wirkungen von Chemo- und Radiotherapie erzielt werden. Auch die Aktivierung des Immunsystems kann für die Kontrolle von Mikrometastasen erforderlich sein. Antagonistische Faktoren, die die Angiogenese des Tumors behindern, könnten beispielsweise mit DTPA-Tyr³-octreotate kombiniert werden. Diese Verbindungen wären somit sowohl für die Szintigraphie als auch die Radionuklid-Therapie einsetzbar. In Zukunft ist auch der Transfer von Genen, die die Expression von Somatostatin-Rezeptoren kodieren, in Tumorzellen denkbar. Auf diese Weise könnte es gelingen, SSTR2- und SSTR5-negative maligne Zellen der endogenen Radiotherapie mit markierbaren Somatostatin-Analoga zugänglich zu machen [KALTSAS ET AL. 2004, DE HERDER ET AL. 2002].

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung vier neu synthetisierter Somatostatin-Analoga als potentielle neue Radiopharmazeutika. Das vom Somatostatin-Molekül abgeleitete Octreotid wird seit längerem in der Onkologie und Nuklearmedizin vielseitig eingesetzt. Natürliches Somatostatin bindet mit gleich hoher Affinität an alle fünf Rezeptorsubtypen, während die synthetischen Somatostatin-Analoga nur an die Somatostatin-Rezeptorsubtypen 2 und 5 mit hoher, im subnanomolaren Bereich liegender Affinität binden. Dadurch ergeben sich Einschränkungen hinsichtlich der klinischen Anwendbarkeit der Analoga. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich daher mit der Entwicklung neuer Somatostatin-Analoga, die durch verbesserte pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften, Rezeptorselektivität und -sensitivität das Anwendungsgebiet der Somatostatin-Analoga erweitern können.

Die vier neu synthetisierten, von SMS-14 abgeleiteten Somatostatin-Analoga U1-4 wurden an den Radiometall-Chelator DTPA gekoppelt und im Hinblick auf die Markierbarkeit mit dem Radionuklid Indium-111, die metabolische Stabilität in humanem Serum, die Rezeptorbindung und Internalisierung *in vitro* und schließlich die Biodistribution im Tiermodell analysiert.

Die Internalisierungsstudien des Radiopeptides wurden an AR42J-Zellen durchgeführt, Zellen eines exokrinen Pankreastumors der Ratte. Ziel dieses Versuchsabschnittes war der Nachweis einer spezifischen Rezeptorbindung und anschließenden Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe in die Zellen.

Die Untersuchung der Biodistribution im Anschluss erfolgte an athymischen und somit immunsupprimierten Nacktmäusen. Vor Versuchsbeginn wurde den Versuchstieren an der Hinterflanke subkutan eine Lösung aus AR42J-Tumorzellen injiziert. Dort war nach einem Zeitraum von ca. vier Wochen ein deutlich ausgeprägter Tumor abgrenzbar. Nach der Injektion der mit dem Radionuklid ¹¹¹In markierten DTPA-Peptide in die Schwanzvene der Versuchsmäuse wurde zu festgelegten Zeitpunkten die Verteilung der injizierten Substanz in verschiedenen Organen und Geweben der Versuchstiere untersucht. Hierzu erfolgte die Präparation und

Entnahme von Herz, Lunge, Milz, Pankreas, Magen, Leber, Nieren, Nebennieren, Dünndarm, Proben von Muskel- und Knochengewebe, einer Blutprobe sowie des gesamten Tumors. Nach Gewichtsbestimmung der entnommenen Proben wurde mit Hilfe eines γ -Counters der Anteil an Aktivität gemessen, der in die jeweiligen Organe und Gewebe aufgenommen wurde.

Die Peptide U1-4 sind durch Abwandlungen der Aminosäuresequenz von Somatostatin-14 entstanden. Die verschiedenen Versuche zeigten, dass die Modifikationen der Aminosäuresequenz die Eigenschaften der Peptide veränderten. Der für therapeutische Anwendungen geforderte Markierungsanteil von über neunzig Prozent wurde von allen vier untersuchten Peptiden erreicht.

Die Serumstabilitätsprüfungen zeigten, dass ^{111}In -DTPA-U3 unter den getesteten Substanzen die höchste Komplexstabilität in humanem Serum aufweist. Die deutlich vermehrte Transferierung des Nuklids auf Serumproteine bei ^{111}In -DTPA-U4 hingegen wird als Einschränkung im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit bewertet.

Im Rahmen der Internalisierungsstudien zeigten sich deutliche Differenzen zwischen den getesteten Substanzen. Die höchsten Internalisierungsraten erreichte das Peptid U2.

Die Bioverteilungsstudien ergaben, dass die Ausscheidung aller untersuchten Substanzen vollständig renal erfolgt. Bei allen vier untersuchten Substanzen wurde der weitaus höchste Uptake in den Nieren gemessen. Die Nieren stellen somit aufgrund der starken Aktivitätsanreicherung das dosislimitierende Organ dar. Eine vermehrte Aktivitätsanreicherung im Tumorgewebe konnte lediglich für U1 nachgewiesen werden, wobei gleichzeitig der geringste Nierenuptake gemessen wurde. Nur mit diesem Peptid könnte es möglich sein, Somatostatin-Rezeptor-positive Tumoren in vivo darzustellen. Die weitere Erforschung und Erprobung dieses Peptids im Hinblick auf eine mögliche Anwendung im diagnostischen Bereich der Nuklearmedizin ist daher sinnvoll.

Literaturverzeichnis

- 1. Anderson, C.J.; Dehdashti, F.; Cutler, P.D.; Schwarz, S.W.; Laforest, R.; Bass, L.A.; Lewis, J.S.; McCarthy, D.W.**
„⁶⁴Cu-TETA-octreotide as a PET imaging agent for patients with neuroendocrine tumors“
J Nucl Med, 42: 213-221, 2001
- 2. Anthony, L.B.; Woltering, E.A.; Espenan, G.D.; Cronin, M.D.; Maloney, T.J.; McCarthy, K.E.**
„Indium-111-pentetreotide prolongs survival in gastroenteropancreatic malignancies“
Semin Nucl Med, 32: 123-132, 2002
- 3. Bauer, W.; Briner, U.; Doepfner, W.; Haller, R.; Huguenin, R.; Marbach, P.; Petcher, T.J.; Pless.**
„SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action“
Life Sci., 31: 1133-40; 1982
- 4. Behr, T.M.; Angerstein, C.; Gratz, S.; Mach, R.; Hagemann, L.; Jenner, N.; Stiehler, M.; Frank-Raue, K.; Raue, F.; Becker, W.**
„Cholecystokinin-B/gastrin receptor binding peptides: preclinical development and evaluation of their diagnostic and therapeutic potential“
Clin Cancer Res., 5: 3124-38; 1999b
- 5. Behr, T.M.; Behe, M.P.**
„Cholezystokinin-B/gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other Cholezystokinin-B receptor expression malignancies“
Seminars in Nuclear Medicine, Vol. XXXII, No.2: 97-109; 2002

6. **Behr, T.M.; Behe, M.P.; Angerstein, C.**
„Cholecystokinin (CCK)-B/gastrin-receptor binding peptides for diagnosis and therapy of metastatic medullary thyroid cancer“
J Nucl Med., 42: 157p; 2001b

7. **Behr, T.M.; Behe, M.P.; Becker, W.**
„Diagnostic applications of radiolabeled peptides in nuclear endocrinology“
Q J Nucl Med., 43: 269-280; 1999c

8. **Behr, T.M.; Gotthardt, M.; Barth, A.; Behe, M.**
„Imaging tumors with peptide-based radioligands“
Q J Nucl Med., 45: 189-200; 2001a

9. **Behr, T.M.; Jenner, N.; Behe, M.; Angerstein, C.; Gratz,S.; Raue, F.; Becker, W.**
„Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors: From preclinical development to initial clinical results“
J Nucl Med., 40: 1029-44; 1999a

10. **Bell, G.I.; Yasuda, K.; Kong, H.; Law, S.F.; Raynor, K.; Reisine, T.**
„Molecular biology of somatostatin receptors“
Ciba Found Symp., 190:656-79, discussion 80-8; 1995

11. **Brazeau, P.; Vale, W.; Burgus, R.; Ling, N.; Butcher, M.; Rivier, J.; Guillemin, R.**
„Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone“
Science, 179: 77-9; 1973

12. **Breeman, W.A.P.; de Jong, M.; Kwekkeboom, D.J.; Valkema, R.; Bakker, W.H.; Kooij, P.P.M.; Visser, T.J.; Krenning, E.P.**
“Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives”
Eur J Nucl Med, 28 (9), 2001

13. **Bruns, C.; Weckbecker, G.; Raulf, F.; Lubbert, H.; Hoyer, D.**
„Characterization of somatostatin receptor subtypes“
Ciba Found Symp.; 190: 89-101, discussion 101-110; 1995

14. **de Herder, W.W.; Lamberts, S.W.**
„Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses“
Curr Opin Oncol, Volume 14(1): 53-57, 2002

15. **de Jong, M.; Breeman, W.A.P.; Bakker, W.H.; Kooij, P.P.M.; Bernard, B.F.; Hofland, L.J.; Visser, T.J.; Srinivasan, A.; Schmidt, M.A.; Erion, J.L.; Bugaj, J.E.; Mäcke, H.R.; Krenning, E.P.**
“Comparison of (111)In-labeled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy”
Cancer Res, 58: 437-441, 1998

16. **Degen, L.; Beglinger, C.**
„The role of octreotide in the treatment of gastroenteropancreatic endocrine tumors“
Digestion, 60 (suppl 2): 9-14, 1999

17. **Dutuor, A.; Kumar, U.; Panetta, R.; L'Hovine Ouafik; Fina, F.; Sasi, R.; Patel, Y.C.**
„Expression of somatostatin receptor subtypes in human brain tumors“
Int J Cancer, 76: 620-27; 1998

18. **Froidevaux, S.; Heppeler, A.; Eberle, A.N.; Meier, A.M.; Häusler, M.; Beglinger, C.; Behe, M.; Powell, P.; Mäcke, H.**
„Preclinical comparison in AR4-2J tumor bearing mice of four radiolabeled 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-somatostatin analogs for tumor diagnosis and internal radiotherapy“
Endo, 141 (9): 3304-12; 2000

19. **Hammond, P.J.; Wade, A.F.; Gwilliam, M.E.; Peters, A.M.; Myers, M.J.; Gilbey, S.G.; Bloom, S.R.; Calam, J.**
„Amino acid infusion blocks renal tubular uptake of an indium-labeled somatostatin analogue“
Br J Cancer, 67: 1437-9; 1993

20. **Henning, I.M.; Laissue, J.A.; Horisberger, U.; Reubi, J.C.**
„Substance P receptors in human primary neoplasms“
Int J Cancer, 61: 786-92; 1994

21. **Hipkin, R.W.; Friedmann, J.; Clark, R.B.; Eppler, C.M.; Schonbrunn, A.**
„Agonist induced desensitization, internalization and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor“
J Biol Chem., 272: 13869-76; 1997

22. **Hofland, L.J.; Lamberts, S.W.**
„Somatostatin receptor subtype expression in human tumors“
Ann Oncol 12(suppl 2): 31-36, 2001

23. **Hofsli, E.; Thommesen, L.; Nørsett, K.; Falkmer, S.; Syversen, U.; Sandvik A.K., Lægreid, A.**
„Expression of chromogranin A and somatostatin receptors in pancreatic AR42J cells“
Molecular and Cellular Endocrinology, 194: 165-173; 2002

24. **Kaltsas, G.A.; Besser, G.M.; Grossmann, A.B.**
„The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors“
Endocrine Reviews, 25(3): 458-511; 2004
25. **Kopin, A.S.; Lee, Y.M.; McBride, E.W.; Miller, L.J.; Lu, M.; Lin, H.Y.;
Kolakowski, L.F. Jr.; Beinborn, M.**
„Expression, cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor“
Proc Natl Acad Sci USA, 89: 3605-9; 1992
26. **Krenning, E.P.; de Jong, M.; Kooij, P.P.; Bakker, W.H.; de Herder, W.W.; van
Eijck, C.H.; Kwekkeboom, D.J.; Jamar, F.; Pauwels, S.; Valkema, R.**
„Radiolabelled somatostatin analogue(s) for peptide receptor scintigraphy and
radionuclide therapy“
Ann Oncol, 10(suppl 2): 23-29, 1999
27. **Krenning, E.P.; Kwekkeboom, D.J.; Bakker, W.H.; Breeman, W.A.P.; Kooij,
P.P.M.; Oei, H.Y.; van Hagen, M.; Postema, P.T.E.; de Jong, M.; Reubi, J.C.;
Visser, T.J.; Reijs, A.E.M.; Hofland, L.J.; Koper, J.W.; Lamberts, S.W.J.**
“Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]- and [¹²³I-Tyr³]-octreotide:
the Rotterdam experience with more than 1000 patients”
Eur J Nucl Med, 20(8), 1993b
28. **Krenning, E.P.; Kwekkeboom, D.J.; Pauwels, S.; Kvols, L.K.; Reubi, J.C.**
„Somatostatin receptor scintigraphy“
in: Freeman, L.M., editor. Nuclear Medicine Annual 1995; New York, Raven Press: 1-50;
1995

29. **Krenning, E.P.; Kwekkeboom, D.J.; Reubi, J.C.; Van Hagen, M.; Van Eijck; Oei, H.Y.; Lamberts, S.W.**
„¹¹¹In-octreotide scintigraphy in oncology“
Digestion, 54 (Suppl.1): 84-87; 1993a
30. **Lamberts, S.W.; Uitterlinden, P.; Verschoor, L.; van Dogen K.J.; del Pozo, E.**
„Long termed treatment of acromegaly with the somatostatin analogue SMS 201-995“
N Engl J Med., 313: 1576-80, 1985
31. **Lamberts, S.W.; van der Lely, A.J.; de Herder, W.W.; Hofland L.J.**
„Octreotide“
N Engl J Med., 334: 246-54; 1996
32. **Lamberts, S.W.J.; Krenning, E.P.; Reubi, J.C.**
“The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumours”
Endocr Rev, 12: 450-482, 1991
33. **Mandarino, L.; Stenner, D.; Blanchard, W.; Nissen, S.; Gerich, J.; Ling, N.; Brazeau, P.; Bohlen, P.; Esch, F.; Guillemin, R.**
„Selective effects of somatostatin-14, -25 and -28 on in vitro insulin and glucagon secretion“
Nature, 291: 76-7; 1981
34. **Meyerhof, W.**
„The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view“
Rev Physiol Biochem Pharmacol., 133: 55-108; 1998

35. **Motta-Hennessey, C.; Sharkey, R.M.; Goldenberg, D.M.**
„Metabolism of indium-111-labeled murine monoclonal antibody in tumor and normal tissue of the athymic mouse“
J Nucl Med., 31: 1510-9; 1990
36. **Nock, B.A.; Maina, T.; Behe, M.; Nikolopoulou, A.; Gotthardt, M.; Schmitt, J.S.; Behr, T.M.; Mäcke, H.R.**
„CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with ^{99m}Tc-labeled minigastrin analogs“
J Nucl Med., 46(10): 1727-36; 2005
37. **Patel, Y.C.**
„Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes“
J Endocrinol Invest., 20: 348-67; 1997
38. **Patel, Y.C.**
„Somatostatin and its receptor family“
Front Neuroendocrinol., 20: 157-198; 1999
39. **Patel, Y.C.; Greenwood, M.T.; Panetta, R.; Demchyshin, L.; Niznik, H.; Srikant, C.B.**
„The somatostatin receptor family: a mini- review“
Life Sci.; 57: 1249-65; 1995
40. **Patel, Y.C., Lin, J.L.; Galanopoulou, A.S.; Papachristou, D.N.**
„Production, action and degradation of somatostatin“
in : Jefferson, L.S.; Cherrington, A.D.; Eds. „The handbook of physiology, The endocrine pancreas and regulation of metabolism“; New York: Oxford Univ. Press, 1999

41. **Patel, Y.C.; Murthy, K.K.; Escher, E.E.; Banville, D.; Spiess, J.; Srikant, C.B.**
„Mechanism of action of somatostatin: an overview of receptor function and studies of the molecular characterization and purification of somatostatin receptor proteins“
Metabolism; 39 (9Suppl.2): 63-9; 1990
42. **Patel, Y.C.; Srikant, C.B.**
„Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr1-5)“
Endocrinology, 135: 2814-7; 1994
43. **Pinski, J.; Schally, A.V.; Halmas, G.; Szepeshazi, K.; Groot, K.**
„Somatostatin analogues and Bombesin/Gastrin-Releasing Peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of human glioblastomas in vitro and in vivo“
Cancer Res, 54: 5895-5901; 1994
44. **Reichlin, S.**
„Somatostatin“
N Engl J Med., 309: 1495-1501, 1556-1563; 1983
45. **Reisine, T.; Bell, G.I.**
„Molecular properties of somatostatin receptors“
Neuroscience, 67: 777-90; 1995
46. **Reubi, J.C.**
„Regulatory peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy“
Q J Nucl Med., 41: 63-70; 1997

47. **Reubi, J.C.; Horisberger, U.; Kappeler, A.; Laissue, J.A.**
 „Localization of receptors for vasoactive intestinal peptide, somatostatin and substance P in distinct compartments of human lymphoid organs“
 Blood; 92:191-7; 1998
48. **Reubi, J.C.; Kappeler, A.; Waser, B.; Laissue, J.A.; Hipkin, R.W.; Schonbrunn, A.**
 „Immunohistochemical localization of somatostatin receptors sst2A in human tumors“
 Am J Pathol, 153: 233-45; 1998
49. **Reubi, J.C.; Kvols, L.K.; Waser, B. et al.**
 „Detection of somatostatin receptors in surgical and percutaneous needle biopsy samples of carcinoids and islet cell carcinomas“
 Cancer Res, 50: 5969-5977, 1990
50. **Reubi, J.C.; Maurer, R.; Klijn, J.G.M.; Stefanko, S.Z.; Foekens, J.A.; Blaauw, G.; Blankenstein, M.A.; Lamberts, S.W.**
 „High incidence of somatostatin receptors in human meningiomas: biochemical characterization“
 J Clin Endocrinol Metab., 63: 433-38; 1986
51. **Reubi, J.C.; Schaer, J.C.; Waser, B.**
 „Cholecystokinin(CCK)-A and CCK.B/gastrin receptors in human tumors“
 Cancer Res., 57: 1377-86; 1997a
52. **Reubi, J.C.; Schaer, J.C.; Markwalder, R.; Waser, B.; Horisberger, Laissue, J.A.**
 „Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissue: recent advances and potential relevance“
 Yale J Biol Med.; 70: 471-9; 1997

53. **Reubi, J.C.; Schaer, J.C.; Waser, B.; Wenger, S.; Heppeler, A.; Schmitt, J.S.; Mäcke, H.R.**
“Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use”
Eur J Nucl Med, 27 (3): 273-282, 2000
54. **Reubi, J.C.; Waser, B.**
„Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin-receptors in human medullary thyroid cancer“
Int J Cancer, 67: 644-7; 1996
55. **Reubi, Y.C.; Waser, B.; Schaer, J.C., Laissue, J.A.**
„Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype selective ligands“
Eur J Nucl Med., 28: 836-46; 2001
56. **Schonbrunn, A.; Tashjian, H.Jr.**
„Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture“
J Biol Chem., 253: 6473-83; 1978
57. **Schwartz, C.J.; Kimberg, D.V.; Sheerin, H.E.; Field, M.; Said, S.I.**
„Vasoactive intestinal peptide stimulation of adenylate cyclase and active electrolyte secretion in intestinal mucosa“
J Clin Invest., 54: 536-44; 1974
58. **Siler, T.M.; VandenBerg, G.; Yen, S.S.; Brazeau, P.; Vale, W.; Guillemin,R.**
„Inhibition of growth hormone release in humans by somatostatin“
J Clin Endocrinol Metab., 37: 632-4; 1973

59. **Slooter, G.D.; Mearadji, A.; Breeman, W.A.P.; Marquet, R.L.; de Jong, M.; Krenning, E.P.; van Eijck, C.H.J.**
 „Somatostatin receptor imaging, therapy and new strategies in patients with neuroendocrine tumors“
 British Journal of Sugery, 88: 31-40, 2001
60. **Sricant, C.B.; Patel, Y.C.**
 „Receptor binding of somatostatin-28 is tissue specific“
 Nature, 294: 259-60; 1981
61. **Tran, V.T.; Beal, M.F.; Martin, J.B.**
 „Two types of somatostatin receptors differentiated by cyclic somatostatin analogs“
 Science, 228: 492-5; 1985
62. **Van Hagen, P.M.; Breeman, W.A.P.; Reubi, J.C.; Postema, P.T.E.; van den Anker Lugtenburg, P.J.; Kwekkeboom, D.J.; et al.**
 „Visualization of the thymus by substance P receptor scintigraphy in man“
 Eur J Nucl Med, 23: 1508-13, 1996
63. **Veber, D.F.; Saperstein, R.; Nutt, R.F.; Freidinger, R.M.; Brady, S.F.; Curly, P.; Perlow, D.S.; Paleveda, W.J.; Colton, C.D.; Zacchei, A.G. et al.**
 „A super active cyclic hexapeptide analog of somatostatin“
 Life Sci., 34: 1371-8; 1984
64. **Virgolini, I.; Raderer, M.; Kurtaran, A.; Angelberger, P.; Banyai, S.; Yang, Q.; Li, S.; Banyai, M.; Pidlich, J.; Niederle, B. et al.**
 „Vasoactive intestinal peptide-receptor imaging for the localization of intestinal adenocarcinomas and endocrine tumors“
 N Engl J Med., 331: 1116-21; 1994

65. Wank, S.A.; Pisegna, J.R.; de Weerth, A.

„Cholecystokinin receptor family. Molecular cloning, structure and functional expression in rat, guinea pig and human“

Ann N Y Acad Sci., 713: 49-66; 1994

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren (in alphabetischer Reihenfolge):

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Behr, Bertalanffy, Beyer, Bien, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Gemsa, Geus, Gerdes, Görg, Gotthardt, Gotzen, Greger, Griss, Grezeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Hellinger, Hesse, Höffken, Hofmann, Höltermann, Hörle, Joseph, Jungclas, Kern, Klaus, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lammel, Lange, Lennartz, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Prinz, Radsak, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer H, Schäfer J, Schäfer M, Schmidt, Schüffel, Schnabel, Schüffel, Seitz, Sekundo, Seyberth, Sommer, Steiniger, Stempel, Suske, Vogelmeier, Vohland, Wagner H-J, Wagner U, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wolf, Wulf

Meine akademischen Lehrer in Kassel waren die Herren (in alphabetischer Reihenfolge):

Effert, Faß, Jacob, Klammer, Neuzner, Pausch, Raible, Vogt, von Ditzfurth

Meine akademischen Lehrer in Erfurt waren die Damen und Herren (in alphabetischer Reihenfolge):

Hochheim, Linse

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Thomas M. Behr danke ich für die Betreuung dieser Dissertation. Er war jederzeit bei der Planung und Entwicklung der Versuchsabläufe, auf denen diese Arbeit basiert, eine verlässliche Hilfe. Insbesondere möchte ich mich für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Martin Béhé für seine wissenschaftliche und persönliche Unterstützung, die mir während der gesamten Zeit zuteil wurde. Durch seine Diskussionsbereitschaft, seine zahlreichen wertvollen Ratschläge und Ideen bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente hat er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonderer Dank gebührt auch Birgit Herbst-Brück, die mich bei der Arbeit im Labor sowie in der Zellkultur jederzeit unterstützt hat.

Bei allen Mitarbeitern der nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums Marburg bedanke ich mich für ihre zuverlässige Hilfe bei den Problemen der täglichen Arbeit im Labor sowie in administrativen und organisatorischen Fragen.

Bei der Firma Bachem bedanke ich mich für die Synthese der verwendeten Peptide.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. So danke ich meiner lieben Großmutter Martha Winzer, meiner lieben Mutter Christel und meiner lieben Schwester Antje dafür, dass sie mich jederzeit unterstützt und auf meinem Weg ermutigt haben. Meinem Freund Michael danke ich vor allem für seine praktische, fachliche, insbesondere aber menschliche Unterstützung während der letzten Jahre. Bei Matthias Schmidt bedanke ich mich für seine geduldige Hilfe bei der Fertigstellung der Druckversion dieser Arbeit.